Synthese und enzymatischer Abbau von Arginylpeptiden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gottfried Zankl
aus Politz Elbe

7267

1962

Synthese und enzymatischer Abbau von Arginylpeptiden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gottfried Zankl
aus Politz/Elbe

1962

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1962

Dekan: Professor Dr. Karl Grell

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. Günther Weitzel

2. Berichterstatter: Professor Dr. Gerhard Schramm

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn

Professor Dr. Dr. G ü n t h e r W e i t z e l

am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen ausgeführt.

Ich danke meinem Lehrer für die Überlassung des Themas und die grosszügige Förderung der vorliegenden Untersuchungen.

Ich danke ferner Herrn Dozenten Dr. Eckhart Buddecke für seine Unterstützung bei den biologischen Versuchen, sowie Herrn Dr. Friedhelm Schneider und Herrn Dr. Werner Schaeg für viele wertvolle Anregungen. Frau Dr. Anna-Marie Fretzdorff, Fräulein Irene Cassel und Fräulein Irmgard Dunker danke ich für analytische Arbeiten.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung und Fragestellung	5
II.	Wege zur Synthese von Arginylpeptiden	7
III.	Eigene Untersuchungen	
	1. Synthesen	
	a) Geschützte Peptide mit N-terminalem Arginin	12
	b) Geschützte Peptide mit C-terminalem Arginin	16
	c) Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-N^{ω}-carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester	19
	d) Freie Peptide	19
	e) Reaktionsschemata	22
	f) pK-Werte	29
	2. Enzymatische Abbauversuche	
	a) Spaltung durch Peptidasen	31
	b) Spaltung durch Serum	36
	c) Einwirkung von Arginase	38
	d) Ergebnisdiskussion der Enzymversuche.	38
IV.	Beschreibung der Versuche	42
V.	Zusammenfassung	57
VI.	Literaturverzeichnis	58
Lebenslauf		63

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung

In der belebten Natur sind Guanidyl-Verbindungen weit verbreitet; sie finden sich im Pflanzenreich und bei allen Tierklassen.[1)2)] Beispiele hierfür sind das Galegin (1-Guanidyl-3-methyl-buten-2) aus dem Gaisklee Galega officinalis oder das in der Sojabohne Soja hispida und in der Jackbohne Canavalis ensiformis enthaltene Canavanin (α-Amino-γ-guanidyloxy-buttersäure). Agmatin (4-Guanidyl-butylamin) ist in zahlreichen Wirbellosen enthalten und Octopin (ein Kondensationsprodukt aus Arginin und Brenztraubensäure) wurde aus dem Tintenfisch Octopus octopodia isoliert. Kreatin (Methyl-guanido-essigsäure) fand man in der Muskulatur höherer Tiere ebenso wie etwa in der Lederkoralle. Auch Mikroorganismen enthalten zuweilen Guanidyl-Verbindungen: Am bekanntesten sind Streptomycin und Streptidin aus Streptomyces griseus.

Unter den Guanidoverbindungen nimmt die Aminosäure Arginin eine Sonderstellung ein, weil die in Eiweisskörpern auftretenden Guanidogruppen praktisch durchweg ihr angehören. Fast alle Proteine enthalten einen oder mehrere Argininreste. Dabei fallen einige Eiweisskörper durch extrem hohen Argigehalt auf: In den Protaminen aus Fisch-Spermatozoen entfallen bis zu 85 % des Stickstoffgehaltes auf Guanidogruppen der Arginylreste. Ebenfalls argininreich sind die Histone, welche in den tierischen Zellkernen die Nucleinsäuren begleiten. Die bisher bekannten Peptidhormone und pharmakologisch aktiven Peptide enthalten sehr häufig Arginin. Argininhaltige Hormone sind z.B. das adrenocorticotrope Hormon (fortan ACTH) aus dem Vorderlappen, das melanocytenstimulierende Hormon (fortan MSH) aus dem Mittellappen und das Vasepressin aus dem Hinterlappen der Hypophyse, sowie Insulin und Glucagon aus dem Inselgewebe des Pankreas. Bei den physiologisch wirksamen Peptiden findet man z.B. im stark blutdruckerhöhenden Angiotensin (Hypertensin) einen Arginylrest[3)]. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang das ebenfalls kreislaufwirksame Bradykinin[3)], ein Nonapeptid, das u.a. durch

Schlangengiftproteasen aus grösseren Peptidverbänden herausgelöst wird. Es besitzt am Amino- wie auch am Carboxylende der Peptidkette je einen Arginylrest.

Die hohe Basizität der Guanidogruppe spielt sicherlich bei den verschiedensten chemischen Umsetzungen eine Rolle. Am Vasopressin konnten DU VIGNEAUD et al.[4] zeigen, dass sich dort die Aminosäuren Arginin und Lysin ohne Beeinträchtigung der Wirkung gegenseitig vertreten können. Rinder-Vasopressin enthält Arginin, dasjenige des Schweines statt dessen Lysin. Dagegen tritt Wirkungsverlust oder Wirkungsumkehr ein, sobald Lysin oder Arginin durch eine nicht-basische Aminosäure ersetzt werden[5]. Ob im Insulin der Arginylrest an der Wirkung beteiligt ist, ist noch umstritten.

Wie man weiss, sind an der Aktivität eines Peptidwirkstoffes nicht alle Aminosäuren in gleichem Masse beteiligt. So kann man 120 Aminosäuren vom Aminoende des Papains abspalten, ohne dessen proteolytische Aktivität nennenswert zu beeinträchtigen[6]. Es liegt nun nahe, die aktiven Zentren bei trifunktionellen Aminosäuren zu suchen. In der Tat häufen sich bei vielen Peptidwirkstoffen trifunktionelle Aminosäuren an bestimmten Stellen des Moleküls. Im ACTH z.B. treten die Sequenzen lys-lys-arg-arg und glu-his-phe-arg-tyr auf, glu-asp-asp-arg findet sich im Cofibrin[7] und asp-ser-arg-arg im Glucagon. Auf Grund der hohen Reaktionsfähigkeit der Guanidogruppe kann man vermuten, dass sowohl bei Peptiden von Hormoncharakter wie bei Fermenten die Arginylreste an der physiologischen Wirkung beteiligt sind. Nur bei einigen Fermentproteinen ist diese Beteiligung bisher gesichert, der genaue Reaktionsmechanismus im Rahmen der Fermentwirkung ist jedoch bis jetzt unbekannt. Erlanger[8] hat in neuerer Zeit für das Zusammenwirken von Arginin, Asparaginsäure und Serin bei der Tätigkeit proteolytischer Fermente eine Hypothese aufgestellt: Dabei wird eine reversible Acylierung des Arginin-Guanidylrestes durch die β-Carboxylgruppe der Asparaginsäure diskutiert. Serin würde durch Ausbildung geeigneter Wasserstoffbrücken den Reaktionsablauf erleichtern.

Der vorstehende Überblick lässt erkennen, dass über die speziellen Eigenschaften von Arginylresten in Peptidketten noch weitgehend Unkenntnis besteht. Dies liegt vor allem

daran, dass eine genügende Zahl synthetischer Arginylpeptide für Modelluntersuchungen bisher nicht verfügbar war. Denn auf Grund seiner Struktur setzt das Arginin der Peptidsynthese besondere Schwierigkeiten entgegen, die sich noch vermehren, wenn man in das gleiche Peptid eine zweite trifunktionelle - etwa eine saure - Aminosäure einbauen will. Die Probleme sind also zunächst präparativ-synthetischer Art.

Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Synthese argininhaltiger Tri- und Tetrapeptide und ihrer Verwendung für biochemische Modellversuche. Letztere betreffen die enzymatische Angreifbarkeit von Arginylpeptiden durch einzelne Peptidasen, durch Serum und durch Arginase. Durch Prüfung der synthetischen Arginylpeptide auf ihre Angreifbarkeit durch Peptidasen sollte ermittelt werden, welche Stabilität die einzelnen Sequenzen gegenüber fermentativen Abbauvorgängen besitzen und welche Peptidbindungen zuerst hydrolysiert werden. Die Modellversuche mit Arginase sollten dazu beitragen, die einander widersprechenden Angaben des Schrifttums[9] über die Arginasespezifität zu klären.

II. Wege zur Synthese von Arginylpeptiden

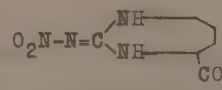
Die ausserordentlichen Schwierigkeiten, die das Arginin allen Peptidsynthesen entgegensetzt, sind zum grossen Teil darauf zurückzuführen, dass die hohe Basizität der Guanidogruppe die Entstehung von Nebenprodukten begünstigt, die dem Hauptprodukt oft hartnäckig anhaften. Die Elementaranalyse ergibt dabei häufig richtige Werte, während zugleich ganz unerwartete Effekte auftreten. Diese Erfahrung machten schon E.FISCHER und U.SUZUKI[10], als sie glaubten, in Analogie zu anderen Diaminocarbonsäuren, durch Selbstkondensation von Argininmethylester Arginylargininmethylester darstellen zu können. Erst BERGMANN und ZERVAS[11] konnten zeigen, dass die nach Fischer hergestellte Substanz ein durch Dismutation entstandenes Gemisch aus α,δ-bis-Guanido-n-valeriansäure und Ornithinmethylester war.

In der Folge erhielten BERGMANN und KÖSTER[12] durch Umsetzung von Acetyl-amino-cinnaminsäure-azlacton mit L-Arginin

und anschliessende Salzsäurebehandlung ein Diastereomerengemisch von D-Phenylalanyl-L-arginin und L-Phenylalanyl-L-arginin aus dem sie aber nur die D-L-Verbindung rein isolieren konnten.

Nun ist aber die Azlactonmethode von nur sehr beschränkter Anwendungsfähigkeit. Die ersten wirklichen Fortschritte auf dem Gebiet der Arginylpeptidsynthesen machten sich mit Einführung der Carbobenzoxygruppe bemerkbar, wobei Arginin zunächst nur als carboxylendständige Aminosäure auftrat. (Carbobenzoxyliert wurden lediglich die Reaktionspartner.) Es gelang damals weder die Darstellung von $N^{\alpha}N^{\omega}$-Dicarbobenzoxy-arginin unter Bedingungen, die sonst durchaus zu disubstituierten Argininen führten[13], noch waren Versuche zur Aktivierung der Carboxylgruppe über das Säurechlorid oder das Azid erfolgreich. Zum Einbau an das Carboxylende genügt aber der Schutz der Guanidogruppierung. So fanden BERGMANN und Mitarbeiter[14] im schon länger bekannten N^{ω}-Nitro-L-arginin[15] und seinen Estern brauchbare Agentien für die Synthese von Peptiden mit carboxylendständigem Arginin. Die Nitrogruppe lässt sich zusammen mit dem Carbobenzoxyrest katalytisch abhydrieren, ist jedoch bedeutend stabiler als dieser.

Aber auch im nitrierten Zustand ist die Guanidylaktivität keineswegs vollständig „stillgelegt". Wie neuere Untersuchungen[16] ergeben haben, bildet N^{ω}-Nitro-arginin beispielsweise mit Basen sehr leicht 2-Nitrimino-2'-carboxy-1,3-diazacycloheptan:



Gerade der Einfluss von Basen aber lässt sich bei Peptidsynthesen nicht immer vermeiden.

So wurde schon vorgeschlagen, auf den Einsatz von Arginin zu Peptidsynthesen überhaupt zu verzichten[17] und zunächst Ornithin zu verwenden, um die δ-Aminogruppe erst nach vollzogener Peptidkupplung mittels Cyanamid oder S-Methylthioharnstoff in die Guanidogruppe zu überführen.

Inzwischen sind jedoch einige grundlegende Fortschritte gemacht worden, die es erlauben, das Arginin auch an seiner

Carboxylgruppe mit anderen Aminosäuren oder Peptiden zu kondensieren.

Verschiedene Arbeitskreise benützten die starke Basizität der Guanidogruppe, um sie mit HBr oder HCl zu maskieren, während ein Carbobenzoxyrest den α-Aminostickstoff schützt. So synthetisierten GISH und CARPENTER[18] Arginylpeptide aus N^{α}-p-Nitro-carbobenzoxy-arginylchlorid-hydrochlorid und ANDERSON[19] verwendete N^{α}-Carbobenzoxy-arginin-hydrobromid zur Darstellung von Arginyl-leucin-acetat nach der Tetraäthylpyrophosphit-Methode. Im Zuge der Darstellung von ACTH-Teilpeptiden haben BOISSONNAS und Mitarbeiter[20] noch in neuester Zeit an der Guanidogruppe protonisiertes Arginin eingesetzt. Die gleiche Methode wurde schliesslich auch bei der Synthese des Arginin-Vasopressins und des Arginin-Vasotocins durch DU VIGNEAUD, GISH und KATSOYANNIS[4,21] mit Erfolg angewandt.

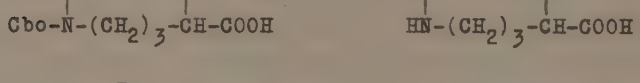
Die weiteste Verbreitung aber fand wohl die Verwendung von N^{ω}-Nitro-N^{α}-carbobenzoxy-L-arginin. Die Substanz war erstmals schon von BERGMANN, ZERVAS und RINKE[14] dargestellt worden, wurde jedoch erst nach Einführung der neueren Peptidverknüpfungsmethoden zu einem brauchbaren Reagens. (Die entsprechende D-Arginyl-Verbindung wurde 1961 von GIBIAN und SCHRÖDER[22] beschrieben.) Bei aminoendständigem Arginin können beide Schutzgruppen hydrogenolytisch entfernt werden, selektive Abspaltung des Carbobenzoxyrestes mit Bromwasserstoff/Eisessig dagegen ermöglicht die Herstellung von Peptiden mit mittelständigem Arginin. VAN ORDEN und SMITH[23] benützten diesen Weg, um nach der „mixed-anhydride"-Methode Arginyldipeptide für enzymatische Untersuchungen zu gewinnen. Ebenso verfuhren K.HOFMANN und Mitarbeiter[24] bei der Synthese von Bruchstücken des ACTH bzw. von Peptiden mit α-MSH-Wirkung. ZAHN und DIEHL[25] schützten die basischen Zentren des Arginins auf gleiche Weise, kuppelten aber mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und nach der Azidmethode. (Wegen der Reaktionsfähigkeit der Nitroguanidylgruppe mit Hydrazin[26] kann die Azidmethode nicht mehr angewandt werden, sobald Nitroarginin einmal im Peptidverband eingebaut ist. Aus demselben Grunde ist auch die Darstellung von N^{ω}-Nitro-arginyl-aziden ausgeschlossen.) Im Zuge der immer aktueller werdenden Synthesen von physiologisch wirksamen Oligopeptiden ging eine ganze

Reihe von Arbeitsgruppen auf ähnliche Weise vor.[27)28)29)30)31)32)33)34)]

Da sich die Nitrogruppe erfahrungsgemäss bei längerkettigen Peptiden immer schwieriger abspalten lässt, verwendeten SCHWYZER und KAPPELER[35)] auch ein kombiniertes Verfahren: Die Nitrogruppe wurde nach den ersten Syntheseschritten abhydriert und der Guanidylrest bei der Verknüpfung zu höhergliedrigen Ketten nur noch durch Protonisierung geschützt.

Eine weitere Möglichkeit wurde von SCHNABEL, LI und Mitarbeitern[36)] beschrieben: Bei der Synthese von Peptiden mit MSH- und ACTH-Sequenz blockierten sie die Guanidogruppe des Arginins durch Tosylierung.

Ganz anders war dagegen die Methode von ZERVAS, OTANI, WINITZ und GREENSTEIN[37)]; ihnen gelang mit der Anwendung von Carbobenzoxychlorid in grossem Überschuss die Herstellung von Tri-carbobenzoxy-L-arginin. Für den Aufbau der Verbindung kamen zunächst zwei Möglichkeiten in Frage:



I

II

Die Entscheidung, welche der beiden Strukturen zutrifft, gelang denselben Autoren[38)] vier Jahre später auf elegante Weise:

Dazu wurde Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-p-nitrobenzylester mit Propionsäureanhydrid in $N^{\alpha},N^{\omega},N^{\omega}$-Tri-carbobenzoxy-$N^{\omega}$-propionyl-L-arginyl-p-nitrobenzylester überführt. Katalytische Hydrogenolyse ergab N^{ω}-Propionyl-L-arginin, das durch Einwirkung von Acetanhydrid in N^{α},N^{ω}-Diacetyl-N^{ω}-propionyl-anhydroarginin umgewandelt wurde. Die darauf folgende Spaltung mit Wasser lieferte N-Acetyl-N'-propionyl-harnstoff und DL-α-Acetylaminopiperidon. Dieser Abbauweg ist mit Struktur II nicht möglich und somit ein Beweis für die Richtigkeit von I.

Über die Tri-carbobenzoxyverbindung kann Arginin bequem als aminoendständige Aminosäure an eine Peptidkette konden-

siert werden. Sowohl N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid als auch die „mixed anhydride"-Methode oder die Methode der„aktivierten"Ester führen hier zu brauchbaren Ergebnissen. Versuche zur Darstellung des N^{ω}-Nitro-N^{α}-carbobenzoxy-arginyl-p-nitrophenylesters mit den üblichen Veresterungsmitteln scheiterten dagegen immer an der bevorzugten Bildung der Anhydroarginylverbindung. Durch Behandlung mit alkoholischem Alkali und Thionylchlorid lassen sich zwei der drei Carbobenzoxyreste wieder entfernen und man gelangt zu N^{ω}-Carbobenzoxy-anhydroarginin, das sich mit Alkoholen in die entsprechenden N^{ω}-Carbobenzoxy-arginylester überführen lässt. Damit kann man Arginin auf dem Umwege über die Tricarbobenzoxyverbindung auch mittel- oder carboxylendständig einbauen. Durch direkte Einwirkung von Thionylchlorid dagegen erhält man N^{ω}-Di-carbobenzoxy-arginin.

SCHWYZER und Mitarbeiter[39)40)] schützten in einer interessanten Variante den α-Aminostickstoff dieser Verbindung durch den t-Butoxycarbonylrest und erhielten so ein weiteres, für Peptidsynthesen ausgezeichnet verwendbares Argininderivat.

III. Eigene Untersuchungen

1. Synthesen

a) Geschützte Peptide mit N-terminalem Arginin

Zum Schutz der Guanidogruppe und der α-Aminogruppe des Arginins verwendeten wir nur den Carbobenzoxyrest. Die Darstellung von Tri-carbobenzoxy-L-arginin[37] ist zwar einerseits mit einem unverhältnismässig hohen Verbrauch an Chlorkohlensäurebenzylester verbunden, da die Anlagerung von drei Carbobenzoxygruppen nur bei grossem Überschuss in befriedigenden Ausbeuten verläuft; andererseits lassen sich die Carbobenzoxyreste nach vollzogener Peptidkupplung glatt katalytisch abhydrieren. N^{ω}-Nitro-L-arginylpeptide sind der Hydrierung weit schwerer zugänglich, lassen sich oft nur unter Druck quantitativ entfernen und liefern gleichzeitig stöchiometrische Mengen an Ammoniumacetat, die sich präparativ kaum entfernen lassen. Dadurch erscheint in den an Nebenprodukten ohnehin nicht armen Arginylpeptidsynthesen ein weiterer Störungsfaktor, der durch Verwendung der Carbobenzoxy-Schutzgruppe umgangen werden kann. Allerdings macht sich beim Umkristallisieren von Tri-carbobenzoxy-arginylpeptiden recht häufig eine hartnäckige Tendenz zur Gelbildung bemerkbar. Die angelagerten Lösungsmittel liessen sich manchmal auch nach mehrstündigem Trocknen im Hochvakuum bei Temperaturen über 100°C nicht vollständig entfernen.

Die Carboxylgruppen wurden nach den jeweiligen Erfordernissen vor der Kupplung mit p-Nitrophenol, Benzylalkohol, Methanol oder Äthanol verestert. p-Nitrophenol wurde nur bei der Darstellung von „aktivierten" Estern[41] angewandt, die zu weiteren Umsetzungen dienten. Die im übrigen nach Möglichkeit hergestellten Benzylester haben den Vorteil, sich mit der Aminoschutzgruppe in einem Arbeitsgang durch katalytische Hydrierung zerlegen zu lassen.

Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-glycyl-benzylester konnte mittels eines „aktivierten" Esters oder N,N'-Dicyclohexylcarbodiimids[42] jeweils in Kombination mit der „mixed-anhydride"-Methode[43], synthetisiert werden. Dazu wurde zunächst Glycin-benzylester-p-toluolsulfonat[37] mit einem gemischten Anhydrid aus N-Trityl-glycin und Chlorkohlensäure-äthylester in absolutem Tetrahydrofuran umgesetzt und die Tritylgruppe anschliessend mit alkoholischer Salzsäure entfernt. Das so gebildete Glycyl-glycyl-benzylester-hydrochlorid liess sich einmal mittels Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylformamid mit Tri-carbobenzoxy-L-arginin kuppeln, zum anderen Mal führte seine Umsetzung mit Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-p-nitrophenylester in Chloroform zum selben Produkt.

Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-p-nitrophenylester wurde aus Tri-carbobenzoxy-L-arginin, p-Nitrophenol (20 % Überschuss) und Dicyclohexylcarbodiimid in Pyridin hergestellt. Bei der Darstellung von p-Nitrophenylestern bewährte sich ganz allgemein Pyridin als sehr vorteilhaftes Lösungsmittel. Der als Nebenprodukt anfallende Dicyclohexylharnstoff löst sich in Pyridin besonders schwer, die „aktivierten" Ester aber sind darin durchweg sehr leicht löslich.

Peptidkupplungen über „aktivierte" Ester haben zwar gegenüber der Kupplung mit Dicyclohexylcarbodiimid den Nachteil einer weiteren Synthesestufe; das entstehende p-Nitrophenol lässt sich jedoch oft leichter entfernen als der Dicyclohexylharnstoff des anderen Weges. Zudem entfällt die Möglichkeit der Bildung von N-(Carbobenzoxy-aminosäure)-N,N'-dicyclohexylharnstoffen[22].

Die Aminolyse des oben genannten „aktivierten" Esters mit Glycyl-glycyl-äthylester[44] führte in befriedigender Ausbeute zum entsprechenden Tri-carbobenzoxy-arginyl-glycyl-glycyl-äthylester, der bei der Verwendung von Essigester als Reaktionsmedium nach einiger Zeit quantitativ auskristallisierte.

Ein für die folgenden Synthesen mehrfach brauchbares Zwischenprodukt fand sich in Form des in grosser Reinheit darstellbaren Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylesters. Da die Veresterung von Carbobenzoxydipeptiden mit p-Nitrophenol häufig zu Racemisierungen führt, wurde die Ver-

bindung durch Umsetzung eines gemischten Anhydrides aus Tri-carbobenzoxy-L-arginin und Chlorkohlensäureäthylester mit Glycyl-p-nitrophenylester hergestellt. Zur Vermeidung von Selbstkondensation wurde die Esterkomponente dabei unter heftigem Rühren durch langsames Zutropfen von Triäthylamin aus ihrem Hydrobromid freigesetzt. (Das Hydrobromid seinerseits entstand aus der entsprechenden Carbobenzoxyverbindung durch Behandlung mit 2-n Bromwasserstoff in Eisessig. Im Gegensatz zu den aus Decarbobenzoxylierungen mit HBr häufig anfallenden amorphen, unerquicklichen Produkten kristallisierte dieses in schönen Prismen, die sich bequem handhaben liessen.)

Das als Lösungsmittel für gemischte Anhydride wegen geringer Racemisierungstendenzen sonst sehr beliebte Tetrahydrofuran[45)] erwies sich in diesem Falle als weniger günstig, da das Reaktionsprodukt zusammen mit Triäthylamin-hydrochlorid und Triäthylamin-hydrobromid als schwierig aufzuarbeitender Schlamm ausfiel. Die meisten Ansätze wurden deswegen in Chloroform (getrocknet über Phosphorpentoxyd) ausgeführt.

Die protonenkatalysierte Veresterung von L-Phenylalanin und DL-Serin mit Benzylalkohol verlief unter Verwendung von p-Toluolsulfonsäure als Protonendonator und Benzol oder Toluol zum azeotropen Abdestillieren des entstandenen Wassers mit guten Ausbeuten. Bei der Herstellung von L-Glutaminsäure-dibenzylester empfiehlt sich allerdings die Verwendung von Benzolsulfonsäure, da p-Toluolsulfonsäure in der Hauptsache zum γ-Benzylester führt. Zur weiteren Reinigung wurde das anfallende Benzolsulfonat in das Hydrochlorid überführt. Die Aminosäurebenzylester-p-toluolsulfonate (bzw. im Falle der Glutaminsäure das Hydrochlorid) wurden in Dimethylformamid gelöst und durch Zugabe der berechneten Menge Triäthylamin in die freien Ester überführt. Triäthylamin-p-toluolsulfonat (bzw. Triäthylamin-hydrochlorid) ist in Dimethylformamid unlöslich und kann vor weiteren Umsetzungen abfiltriert werden. Jeweilige Zugabe von Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylester in stöchiometrischen Mengenverhältnissen führte zur Bildung von Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-benzylester, Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-L-glutamyl-dibenzylester und Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-

DL-seryl-benzylester. Für die Darstellung von Serinpeptiden sind p-Nitrophenylester sehr geeignet, weil die Hydroxylgruppe des Serins nicht gesondert geschützt werden muss: p-Nitrophenylester sind zwar leicht durch Amine, nicht aber durch Hydroxylgruppen verseifbar. Bekanntlich lassen sich p-Nitrophenylester von Peptiden oder Aminosäuren aus Alkohol gut umkristallisieren[46].

Bei der Synthese der Sequenz Arg-glu-α-gly musste ein komplizierterer Weg beschritten werden. Eine Möglichkeit, in analoger Weise wie oben Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-p-nitrophenylester herzustellen, bestand nicht. Es gelang zwar die Darstellung von Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-(γ-benzylester)-α-p-nitrophenylester, nicht jedoch die Abspaltung der Aminoschutzgruppe ohne gleichzeitige Schädigung des γ-Benzylesters. Die Untersuchungsergebnisse von KISFALUDY, DUALSZKY und BAYER[47] über dieses Problem konnten auch im vorliegenden Falle bestätigt werden. GOODMAN und STUEBEN[46] berichten zwar über die Darstellung von L-Glutaminsäure-(γ-benzylester)-α-p-nitrophenylester-hydrobromid durch Abspaltung mit 15-proz. HBr in Eisessig, jedoch ohne genaue Versuchsangaben. Versuche, Tri-carbobenzoxy-L-arginin über ein gemischtes Anhydrid nach der Methode von WIELAND[48] direkt mit dem Natriumsalz oder dem Triäthylammoniumsalz des L-Glutaminsäure-γ-benzylesters zu kondensieren, lieferten ebenfalls kein brauchbares Ergebnis. Auch die eventuelle Umsetzung von Tri-carbobenzoxy-L-arginin mit einem zuerst dargestellten Glutaminsäure-Glycin-Dipeptid hätte keine Verringerung der Schwierigkeiten mit sich gebracht. So verblieb nur der Ausweg, von den sonst so gut verwendbaren Benzylestern abzugeben.

Es wurde zunächst L-Glutaminsäure-γ-methylester hergestellt, was sich mit Thionylchlorid in absolutem Methanol ohne weiteres bewerkstelligen lässt[49]. Weniger gut verlief die Carbobenzoxylierung des entstandenen Hydrochlorides, da das geschützte Reaktionsprodukt recht wenig Kristallisationsfreude zeigt. Die Überführung in den α-p-Nitrophenylester mit Dicyclohexylcarbodiimid in Pyridin ging wiederum glatt vonstatten und die nachfolgende Entcarbobenzoxylierung mit Bromwasser-

stoff/Eisessig lieferte ein kristallines Hydrobromid. Als nächster Schritt folgte die Kupplung mit Tri-carbobenzoxy-L-arginin über ein gemischtes Anhydrid. Dabei wurde der „aktivierte" Aminosäureester zur Vermeidung von Selbstkondensation wieder erst in der Reaktionsmischung durch langsame Zugabe von Triäthylamin aus dem Hydrobromid freigesetzt. Die Aminolyse des nunmehr vorliegenden „aktivierten" Dipeptidesters unter Ausbildung eines Tripeptides erfolgte mit Glycin-äthylester in Dimethylformamid. Anschliessende Verseifung in Tetrahydrofuran/n Natronlauge führte zu Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-L-glutamyl-α-glycin.

b) Geschützte Peptide mit C-terminalem Arginin

Ein Hauptproblem besteht hier darin, ein Argininderivat mit geschützter Guanidogruppe, aber offenem α-Aminostickstoff zu gewinnen. Naheliegend wäre für diesen Zweck wiederum die Nitrierung, die sowieso nur an der Guanidogruppe angreift, gefolgt von einer normalen Veresterung der Carboxylgruppe. Nachteilig ist auch hier die schwere Abspaltbarkeit der Nitrogruppe bei der Überführung in die freien Peptide. Von Nachteil ist ferner die Tatsache, dass N^{ω}-Nitroarginylesterhydrochloride meist sehr hygroskopische und somit schlecht zu handhabende Substanzen sind. Deswegen wurde für die im folgenden beschriebenen Synthesen - mit einer Ausnahme - der von ZERVAS, WINITZ und GREENSTEIN[37] beschriebene, gut kristallisierende N^{ω}-Carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester verwendet. Liegt am N-terminalen Peptidende ebenfalls die Carbobenzoxygruppe vor, kann auch hier die hydrogenolytische Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen in einem Arbeitsgang erfolgen.

Zur Peptidverknüpfung wurde - wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben - die „mixed anhydride"-Methode, die Methode der „aktivierten" Ester und Dicyclohexylcarbodiimid angewandt. Lediglich Carbobenzoxy-glycyl-glycin wurde durch halbseitige alkalische Hydrolyse von 2,5-Dioxopiperazin und nachfolgender Umsetzung mit Carbobenzoxychlorid herge-

stellt. Die Möglichkeit einer derartigen Ringöffnung war schon E.FISCHER[44] bekannt, der Glycyl-glycin und seine Ester auf ähnliche Weise synthetisierte.

Carbobenzoxy-glycyl-glycin wurde nun auf dem bereits erwähnten Wege mit p-Nitrophenol verestert. Die Umsetzung des entstandenen „aktivierten" Esters mit N^{ω}-Carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester lieferte Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-N^{ω}-carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester. Das Produkt fiel jedoch nur dann in genügender Reinheit an, wenn dem Arginylester noch eine äquivalente Menge einer starken Säure (im vorliegenden Falle p-Toluolsulfonsäure) beigegeben wurde: Die hohe Basizität der Guanidogruppe konnte durch eine einzige Carbobenzoxygruppe nicht vollständig aufgehoben werden. Deswegen ist ja unter dem Einfluss von Thionylchlorid oder Phosphorpentachlorid auf N^{α},N^{ω}-Di-carbobenzoxy-L-arginin die leichte Bildung der Anhydroverbindung zu beobachten. (Vgl. S.11)

Zur Synthese der Sequenz Gly-glu-arg wurde zuerst das nichtargininhaltige Dipeptid hergestellt. Dazu wurde Glutaminsäure-γ-benzylester[50] (in Form des α-Triäthylammoniumsalzes) über ein gemischtes Anhydrid mit Carbobenzoxy-glycin kondensiert. Das Reaktionsprodukt machte zunächst einige Kristallisationsschwierigkeiten, lieferte aber nach dem Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther schöne Nadeln. So entstandener Carbobenzoxy-glycyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester wurde mit N^{ω}-Carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid zu Carbobenzoxy-glycyl-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-N^{ω}-carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester verknüpft. Auf durchaus analoge Weise liess sich Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-N^{ω}-carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester herstellen. Nur wurde dabei als erster Reaktionsschritt Carbobenzoxy-glycyl-glycin[51] über ein gemischtes Anhydrid mit dem α-Triäthylammoniumsalz des L-Glutaminsäure-γ-benzylesters gekuppelt. Die Kondensation zum Tetrapeptid wurde wieder mit Dicyclohexylcarbodiimid vorgenommen.

Zur Darstellung eines weiteren Tripeptides wurde als erster Schritt L-Glutaminsäure-γ-benzylester an der Aminogruppe carbobenzoxyliert. Der resultierende Halbester zeigt ebenso-

wenig Kristallisationsfreude wie viele Carbobenzoxyaminosäuren oder deren Ester. Die von GIBIAN, KLIEGER und SCHRÖDER[52] ausführlich untersuchte Überführung von Glutaminsäurehalbestern in ihre Dicyclohexylammoniumsalze ergab auch im vorliegenden Falle ein augenblicklich in grosser Reinheit auskristallisierendes Produkt. Als nächster Schritt erfolgte die Kupplung mit Glycyl-p-nitrophenylester-hydrobromid nach der „mixed-anhydride"-Methode. GIBIAN hat unter anderem den unmittelbaren Einsatz des Dicyclohexylammoniumsalzes zum gemischten Anhydrid vorgeschlagen, wobei Dicyclohexylamin zur Bindung des entstehenden Chlorwasserstoffes dienen sollte. Dieser Weg führte hier nicht zum gewünschten Erfolg. (Man sollte auch annehmen, dass die Anwesenheit eines sekundären Amins auf die Bildung eines gemischten Anhydrides störend wirkt. Bei Versuchen im Tetrahydrofuran schied sich nach Zugabe von Chlorkohlensäureäthylester nicht das sonst an dieser Stelle ausfallende Amin-hydrochlorid ab.) Wurde jedoch Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-(γ-benzylester)-α-dicyclohexylammoniumsalz in Tetrahydrofuran gelöst und mit der äquivalenten Menge HCl in Tetrahydrofuran zerlegt, so bildete sich nach Absaugen vom ausgefallenen Dicyclohexylamin-hydrochlorid das gewünschte Anhydrid ohne weiteres. Kondensation mit Glycyl-p-nitrophenylester-hydrobromid in der bereits beschriebenen Weise ergab nach der üblichen Aufarbeitung Carbobenzoxy-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-glycyl-p-nitrophenylester in einer Ausbeute von 63 %. Die Umsetzung dieses „aktivierten" Dipeptidesters mit N^{ω}-Carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester lieferte (in Anwesenheit einer äquivalenten Menge p-Toluolsulfonsäure) Carbobenzoxy-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-glycyl-N^{ω}-carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester.

Zu Vergleichszwecken wurde auch eine Synthese mit nitriertem Arginin durchgeführt. Die Anwendung von Dicyclohexylcarbodiimid bei der Kondensation von N^{ω}-Nitroarginin-methylester[53] mit Carbobenzoxy-glycyl-glycin erbrachte jedoch nur geringe Ausbeuten an Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-N^{ω}-nitroarginin-methylester. Dieser Weg wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

c) Tri-carbobenzoxy-L-arginyl-glycyl-N^{ω}-carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester

Die Verbindung wurde durch Kombination der in den beiden vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Hauptwege synthetisiert: Der aus Tri-carbobenzoxy-L-arginin und Glycin-p-nitrophenylester-hydrobromid nach der „mixed-anhydride"-Methode hergestellte „aktivierte" Dipeptidester liess sich in Dimethylformamid mit N^{ω}-Carbobenzoxy-L-arginyl-benzylester kondensieren, wobei wiederum p-Toluolsulfonsäure den Schutz der Guanidogruppe vervollständigte.

d) Freie Peptide

Amino- und Carboxylschutzgruppen der unter a), b) und c) beschriebenen geschützten Tripeptide wurden (mit Ausnahme der Nitroverbindung) durch katalytische Hydrierung mit Palladium/Aktivkohle in Methanol/Eisessig entfernt. Die Reinigung der Rohprodukte erfolgte durch mehrmaliges Umfällen bzw. fraktioniertes Fällen aus Wasser/Äthanol und Wasser/Aceton. Eine manchmal auftretende leichte Gelbfärbung liess sich in allen Fällen durch kurzes Aufkochen der wässrigen Lösung mit Aktivkohle beseitigen. Längeres Kochen führte schnell zur hydrolytischen Spaltung in die einzelnen Aminosäuren. Die freien Peptide enthielten zum Teil Wasser und Essigsäure in nicht-stöchiometrischen Mengen, die sich ohne gleichzeitige Schädigung des Moleküls nicht entfernen liessen. Zur Identifizierung dienten Totalhydrolyse mit konzentrierter Salzsäure, enzymatischer Abbau mit Leucinaminopeptidase und potentiometrische Titration.

Neun der zehn dargestellten Peptide gaben dabei die erwarteten Ergebnisse (vgl. auch S.38). Eine Ausnahme machte Arginyl-glycyl-phenylalanin. Die Totalhydrolyse mit konzentrierter Salzsäure lieferte zwar die drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Phenylalanin, die chromatographisch nachgewiesen wurden. Auch der Abbau mit Leucinaminopeptidase ergab dieselben Aminosäurebausteine, jedoch enthielten hier die Chromatogramme jeweils einen nicht-identifizierbaren Fleck,

der sowohl beim Anfärben mit Ninhydrin als auch mit Sakaguchi-Reagens auftrat. Andererseits war die Ninhydrinreaktion des unbehandelten Peptids auffällig schwach. Bei der potentiometrischen Titration mit Natronlauge zeichneten sich Carboxylgruppe und α-Aminogruppe kaum oder überhaupt nicht ab. Diese Erscheinungen waren bei den Endprodukten aus mehreren Ansätzen mehr oder weniger ausgeprägt festzustellen, ohne dass eine eindeutige Klärung dafür gefunden werden konnte. Besonders auf Grund der Titrationsergebnisse könnte man eine teilweise Dimerisierung annehmen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Elementaranalyse. Die Substanz wurde darum zu den biologischen Versuchen nur einmal eingesetzt, nämlich bei der Prüfung des Pepsins, das dann erwartungsgemäss - wenn auch wiederum sehr geringe Mengen - Phenylalanin freimachte.

Die jeweiligen Zahlenindices in Tabelle 1 bedeuten:

1 Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G der Firma E.Merck AG Darmstadt im System n-Propanol/konz. NH_3 67:33

2 Papierchromatographie auf Schleicher u. Schüll No.2043 b Mgl im System n-Butanol/Eisessig/H_2O 4:1:1, aufsteigend

3 Papierchromatographie auf Schleicher u. Schüll No.2043 b Mgl im System Pyridin/H_2O 65:35, aufsteigend

4 Papierchromatographie auf Schleicher u. Schüll No.602 h:p im System Pyridin/H_2O 65:35, absteigend

5 Papierchromatographie auf Schleicher u. Schüll No.2043 b Mgl im System α-Picolin/H_2O 3:2, absteigend

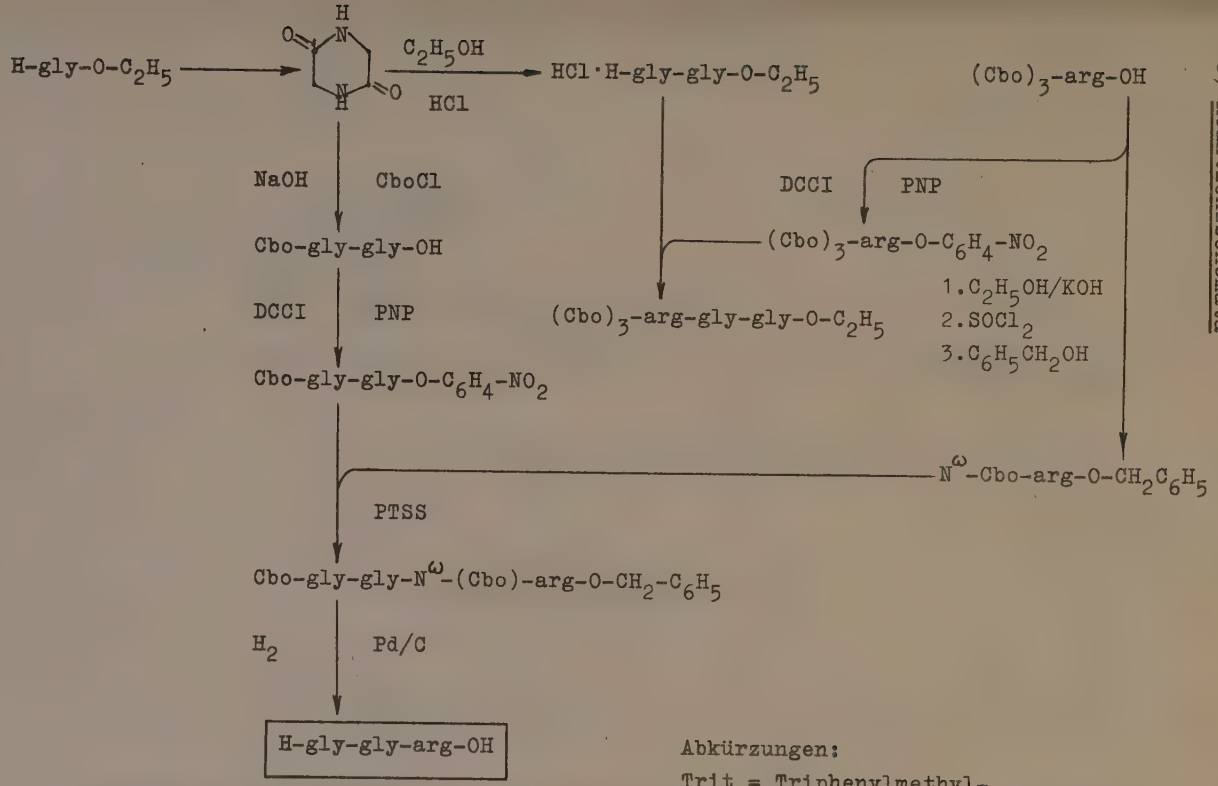
6 Papierchromatographie auf Schleicher u. Schüll No.2043 b Mgl im System α-Picolin/H_2O 3:2, aufsteigend

7 Papierchromatographie auf Schleicher u. Schüll No.602 h:p im System n-Butanol/Dimethylformamid/H_2O 4:5:3 absteigend

Zur besseren Reproduzierbarkeit wurden jeweils Glycin oder Arginin als Vergleichssubstanzen eingesetzt und die Peptid-R_f-Werte auf die R_f-Werte dieser Aminosäuren bezogen.

Tabelle 1. R_f-Werte der dargestellten freien Arginylpeptide

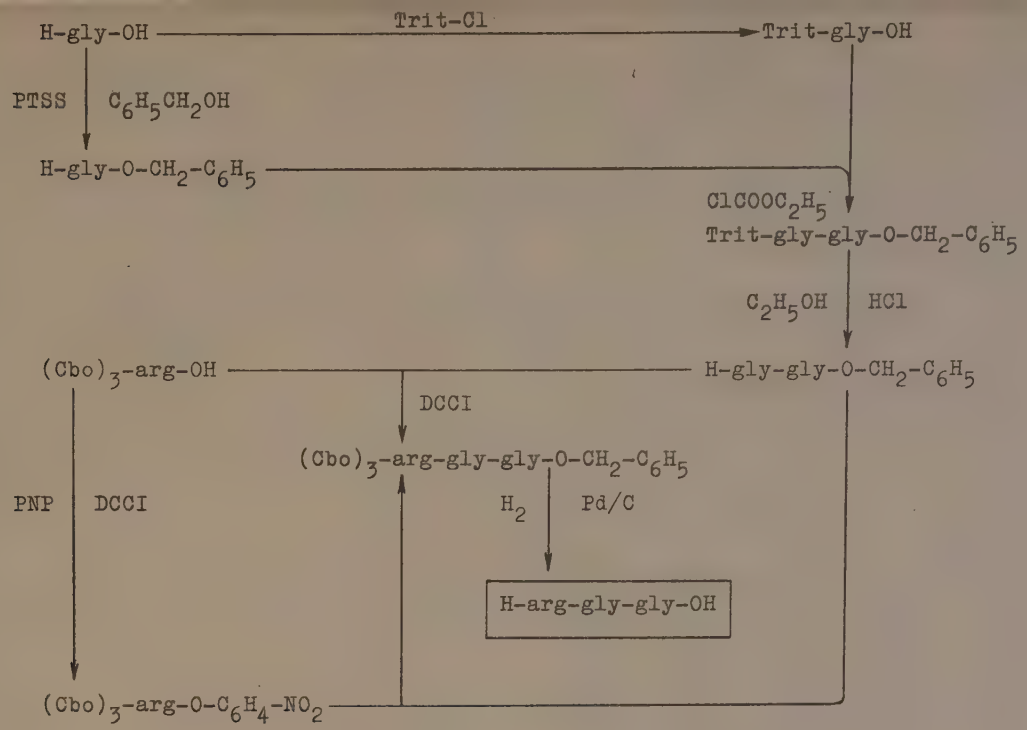
H-gly-gly-arg-OH	R_{f1}	0,53	(Gly = 1,00)
		1,15	(Arg = 1,00)
	R_{f2}	0,53	(Gly = 1,00)
	R_{f3}	0,92	(Gly = 1,00)
	R_{f5}	0,53	(Gly = 1,00)
H-arg-gly-gly-OH	R_{f1}	0,46	(Gly = 1,00)
		1,00	(Arg = 1,00)
	R_{f4}	0,86	(Gly = 1,00)
H-gly-glu-arg-OH	R_{f1}	0,35	(Gly = 1,00)
		0,82	(Arg = 1,00)
	R_{f4}	0,58	(Gly = 1,00)
H-glu-gly-arg-OH	R_{f1}	0,52	(Gly = 1,00)
		1,26	(Arg = 1,00)
	R_{f4}	0,47	(Gly = 1,00)
	R_{f7}	0,71	(Gly = 1,00)
		0,62	(Arg = 1,00)
H-arg-gly-phe-OH	R_{f1}	1,76	(Gly = 1,00)
		3,89	(Arg = 1,00)
	R_{f3}	1,48	(Gly = 1,00)
H-arg-gly-ser-OH	R_{f1}	0,41	(Gly = 1,00)
	R_{f3}	1,26	(Gly = 1,00)
H-arg-gly-arg-OH	R_{f3}	0,41	(Gly = 1,00)
H-arg-gly-glu-OH	R_{f1}	0,26	(Gly = 1,00)
	R_{f6}	0,59	(Gly = 1,00)
H-arg-glu-gly-OH	R_{f1}	0,33	(Gly = 1,00)
	R_{f6}	0,54	(Gly = 1,00)
H-gly-gly-glu-arg-OH	R_{f3}	0,82	(Gly = 1,00)
	R_{f6}	0,77	(Gly = 1,00)



Schema 1

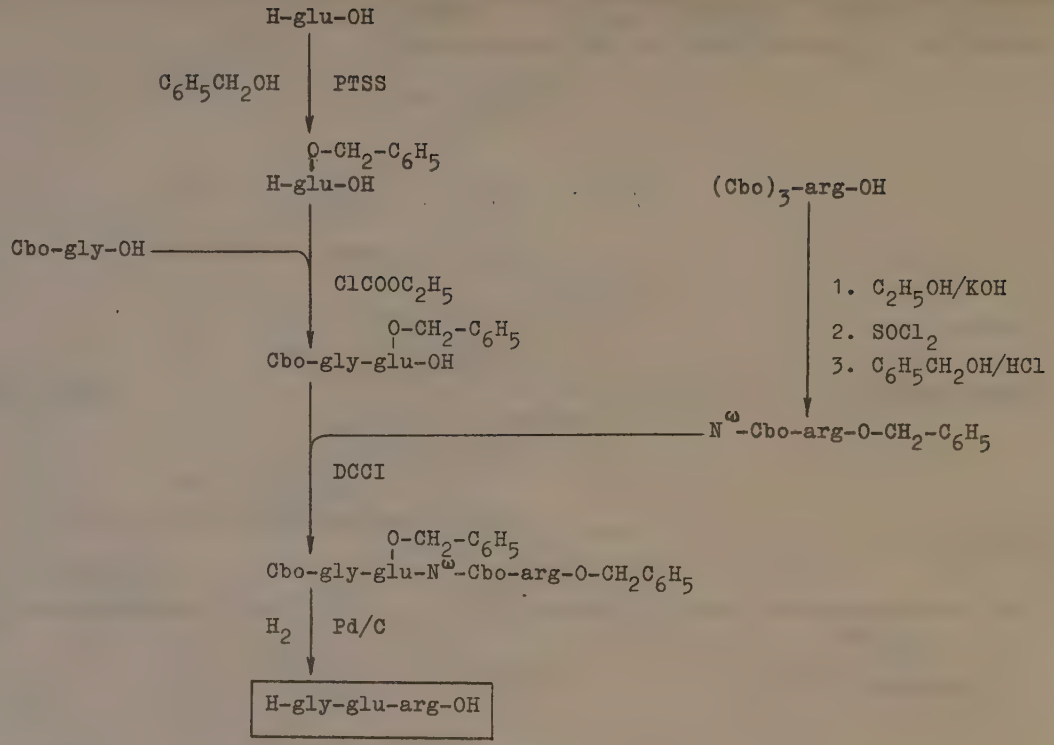
Abkürzungen:

Trit = Triphenylmethyl-
Cbo = Carbobenzoxy-
DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
PTSS = p-Toluolsulfonsäure
PNP = p-Nitrophenol



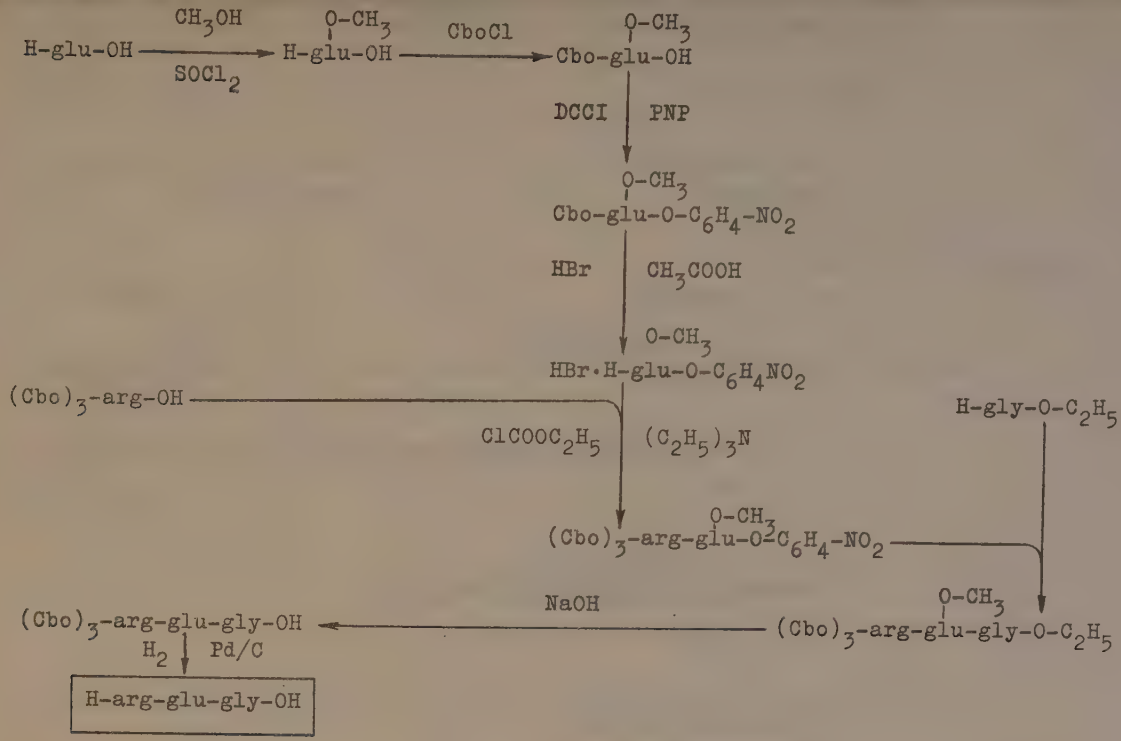
Schema 2

Erklärung der Abkürzungen siehe Schema 1



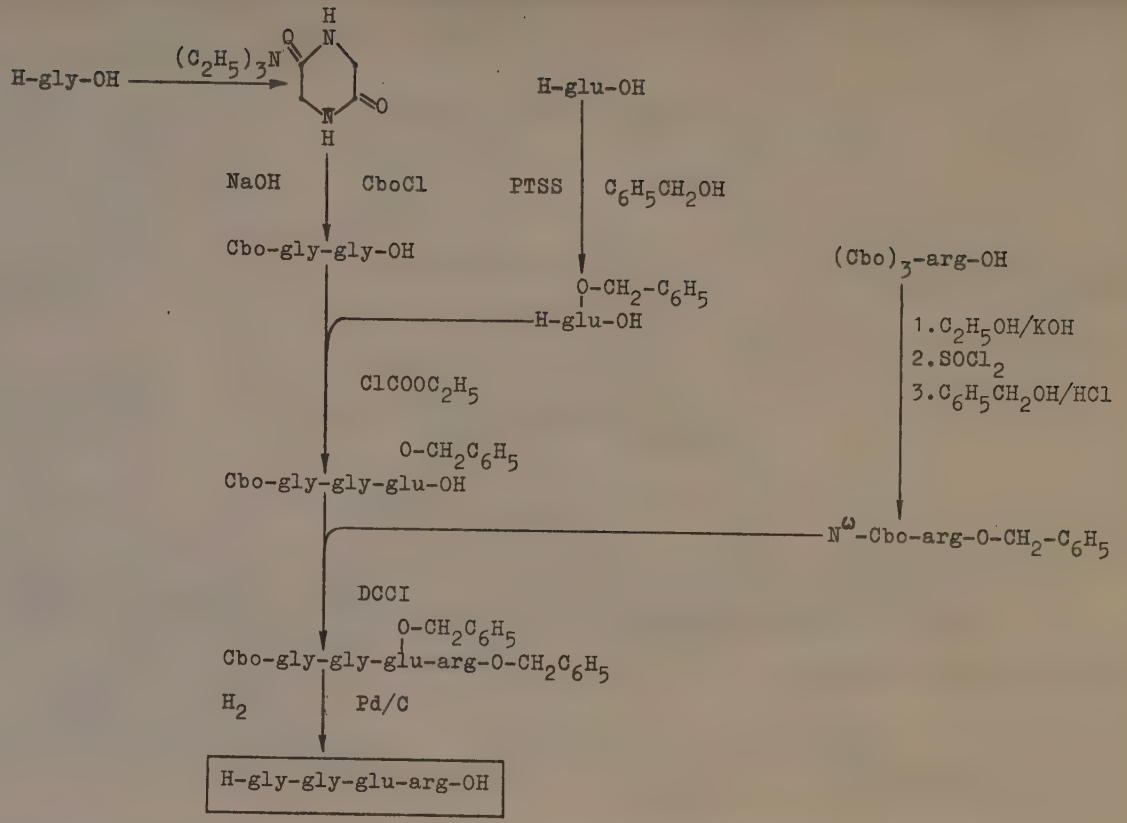
Schema 3

Erklärung der Abkürzungen siehe Schema 1



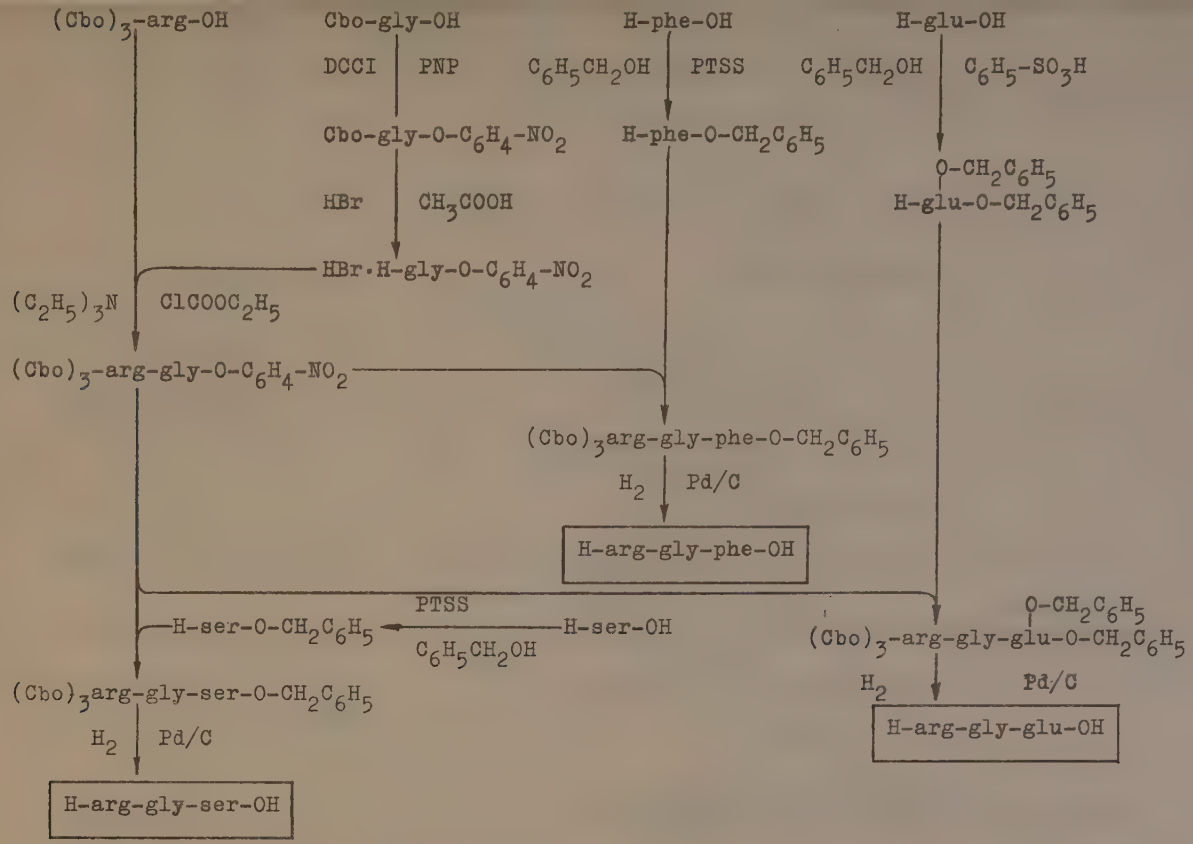
Schema 4

Erklärung der Abkürzungen siehe Schema 1



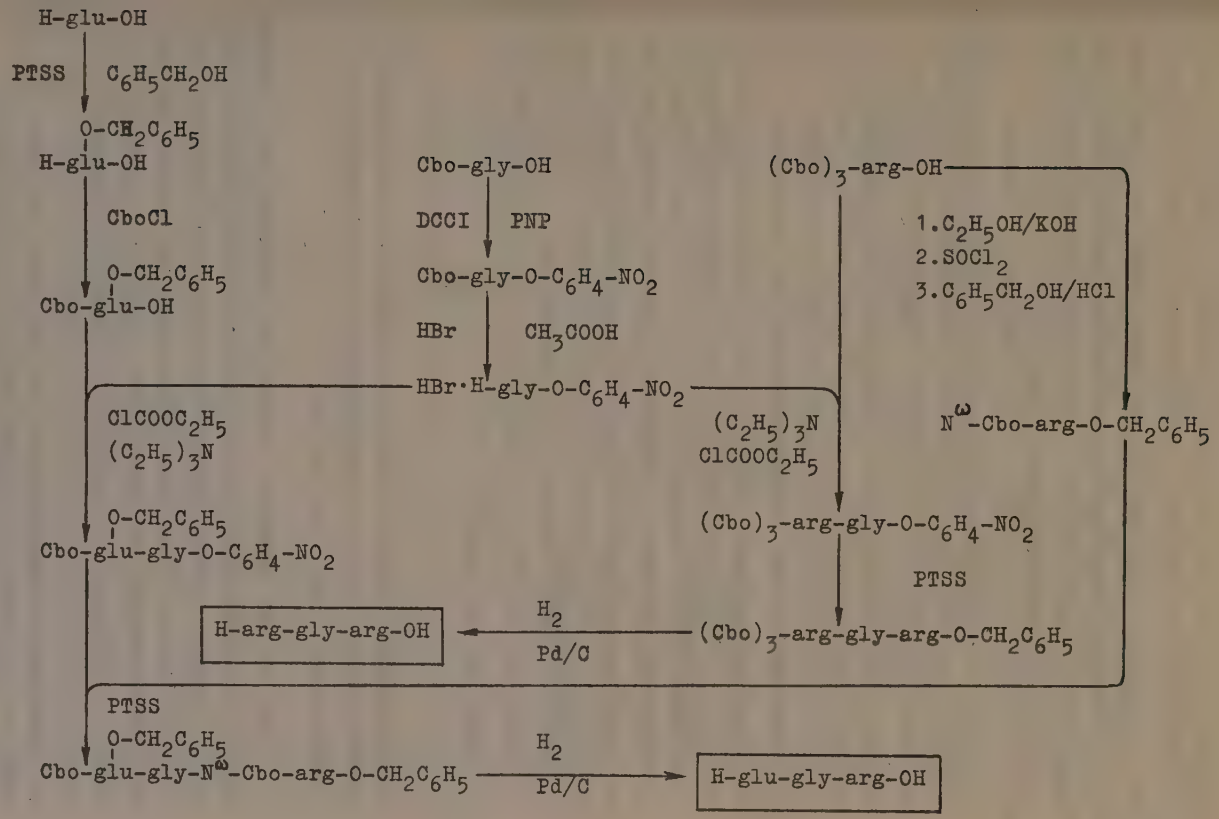
Schema 5

Erklärung der Abkürzungen siehe Schema 1



Schema 6

Erklärung der Abkürzungen siehe Schema 1



Schema 7

Erklärung der Abkürzungen siehe Schema 1

f) pK-Werte

Zum Nachweis der theoretisch vorhandenen basischen und sauren Gruppen sowie zur allgemeinen Definition (vgl. S.19) wurden die freien Peptide mit KOH potentiometrisch titriert. Dabei ergaben sich folgende pK-Werte:

Tabelle 2. pK-Werte der dargestellten freien Arginylpeptide

Peptid	α-NH_2	γ-COOH	Guanidogruppe
H-gly-gly-arg-OH	7,94	-	> 11
H-arg-gly-gly-OH	7,54	-	~ 11,1
H-glu-gly-arg-OH	7,86	4,10	> 11
H-gly-glu-arg-OH	8,19	4,23	> 11
H-arg-gly-glu-OH	7,57	4,35	~ 11,0
H-arg-glu-gly-OH	7,72	4,07	~ 11,1
H-arg-gly-arg-OH	7,30	-	> 11
H-arg-gly-ser-OH	7,31	-	10,72
H-gly-gly-glu-arg-OH	8,10	4,28	~ 11,2

Zum Vergleich titrierter Arginin-methylester ergab einen pK-Wert von 7,25 an der α-Aminogruppe. Der pK-Wert des Guanidylrestes lag etwa bei 11,5.

Die bereits bekannte Senkung von pK-Werten der α-Aminogruppe von Aminosäuren durch Veresterung oder Peptidverknüpfung[54] konnte auch in sämtlichen vorliegenden Fällen bestätigt werden. Bei gleicher Temperatur und Ionenstärke hat die α-Aminogruppe des ungebundenen Arginins einen pK-Wert von 9,11, während bei Glycin und Glutaminsäure pK-Werte von 9,69 bzw. 9,67 gefunden wurden. Demgegenüber liegen die α-NH_2-Dissoziationskonstanten von Peptiden, in denen die genannten Aminosäuren aminoendständig sind, durchweg um

etwa 1,5 Einheiten tiefer (s. Tab.2). Die relativen Unterschiede sind also etwa gleich geblieben. Lediglich Arginin, das im Peptid mit der Aminogruppe der Glutaminsäure verbunden ist, zeigte eine weniger starke Erniedrigung. Dieser Effekt steht im Einklang mit Messergebnissen bei ähnlich gelagerten Fällen (Histidin/Glutaminsäure[55]). Erstaunlich dagegen ist die vergleichsweise nur schwache Erniedrigung der Guanido-pK-Werte. (freies Arginin: 12,48). α,γ-Diaminobuttersäure und α,β-Diaminopropionsäure zeigen z.B. ein erheblich stärkeres Absinken des pK-Wertes am terminalen Stickstoff, sobald die Carboxylgruppe verestert oder durch Peptidbildung verschlossen ist[56]. Selbst der pK-Wert der Cystein-Sulfhydrylgruppe wird durch Veresterung stark gesenkt[57].

Der pK-Wert der γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure lag etwas höher, wenn die Säure im Peptid carboxylendständig war (freie Glutaminsäure: 4,28), dagegen niedriger, sobald sie aminoendständig war. Für den mittelständigen Glutamylrest zeigte sich aminoseitig vom Arginin keine nennenswerte Veränderung, carboxylseitig vom Arginin eine Erniedrigung des γ-Carboxyl-pK-Wertes. Exakte Gesetzmässigkeiten können sich hier erst aus Untersuchungen an umfangreicherem Material ähnlicher Modellsubstanzen ergeben.

2. Enzymatische Abbauversuche

a) Spaltung durch Peptidasen

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen ungeschützten Peptide wurden zunächst der Einwirkung der Verdauungsenzyme Trypsin, α-Chymotrypsin und Pepsin ausgesetzt. Zur Anwendung kamen handelsübliche Fermentpräparate, die ohne weitere Aktivierung in Phosphatpuffer (im Falle des Pepsins in Glycin-Salzsäure-Puffer) inkubiert wurden. Die Spezifität der genannten Enzyme ist zwar weitgehend erforscht, jedoch treten immer wieder bislang unbekannte Effekte auf. Im Renin-Angiotensin-System des Organismus zum Beispiel spaltet Trypsin eine Peptidbindung am Carboxylende des Serins, was recht ungewöhnlich ist[3]. Deshalb erschien die Untersuchung der Einwirkung dieser Fermente auf bisher nicht beschriebene Arginylpeptide angebracht.

α-Chymotrypsin zeigte dabei in sämtlichen Fällen nicht die geringste peptidspaltende Wirkung. Dies entspricht den Erwartungen, da Chymotrypsin an der Carboxylgruppe aromatischer Aminosäuren angreift. Trypsin, das normalerweise an der Carboxylgruppe basischer Aminosäuren angreift, spaltete im Laufe von 15 Stunden nur von Arginyl-glycyl-arginin das aminoendständige Arginin ab. (Dieses Tripeptid zeigte sich auch in der Folge verhältnismässig labil gegenüber enzymatischen Angriffen.) Dass die restlichen Peptide - vor allem diejenigen mit N-terminalem Arginin - unter diesen Bedingungen von Trypsin nicht abgebaut wurden, dürfte weniger eine Folge der zu kurzen Peptidkette als vielmehr eine Folge der freien α-Aminogruppe sein. Denn einerseits ist Benzoylargininamid als Trypsin-Testsubstrat sehr gut verwendbar und andererseits wurde schon häufiger beobachtet[58], dass Argininderivate mit freier α-Aminogruppe von Trypsin nur äusserst langsam gespalten werden.

Pepsin spaltete entsprechend den bekannten Regeln nur an der Aminogruppe des Phenylalanins.

Danach wurde die Einwirkung von L-Leucinaminopeptidase geprüft. Dieses Ferment kommt im Gegensatz zu den vorhergenannten nicht nur im Verdauungstrakt, sondern auch im Serum des tierischen Organismus vor. Es zeigte sich, dass alle vorliegenden Arginylpeptide von L-Leucinaminopeptidase quantitativ zu den einzelnen Aminosäuren abgebaut wurden. Dazu waren allerdings in der Regel über zehn Stunden nötig. Nach einer Stunde entnommene Proben zeigten noch keinerlei chromatographisch nachweisbare Abbauerscheinungen.

Als weiteres Testobjekt diente Pronase, ein erst in neuerer Zeit aus Streptomyces griseus isoliertes proteolytisches Enzym, das einige recht ungewöhnliche Eigenschaften zeigt. Nach den bisher bekannt gewordenen Spezifitätsuntersuchungen[59] nimmt es eine Mittelstellung zwischen Endo- und Exopeptidasen ein und hydrolysiert mit der gleichen Aktivität Proteine wie kürzere Peptidketten. Neben Estern und Amiden spaltet das Ferment bemerkenswerterweise Peptidbindungen auch ohne Rücksicht auf D- oder L-Konfiguration der beteiligten Aminosäuren. Diese Eigenschaften schienen Untersuchungen an Arginylpeptiden zu rechtfertigen. Obwohl das Enzym in einem verhältnismässig weiten Temperaturbereich (35-60°C) aktiv ist, wurde es unter denselben Umständen geprüft wie die vorhergenannten Proteasen, um Aussagen über die Reaktion unter annähernd physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Die Ergebnisse waren ebenso unterschiedlich wie uneinheitlich:

Arginyl-glycyl-arginin wurde in Arginin und Glycyl-arginin gespalten. Das verbleibende Dipeptid blieb weitgehend unverändert. Bei Glycyl-glutamyl-arginin und Diglycyl-glutamyl-arginin wurde in beiden Fällen die Bindung gly-glu getrennt, glu-arg dagegen nur wenig und gly-gly überhaupt nicht angegriffen. Dementsprechend entstand sowohl aus Diglycyl-arginin als auch aus Arginyl-glycyl-glycin Arginin und Glycyl-glycin - und auch dies nur sehr langsam. Der Abbau von Arginyl-glycyl-serin lieferte nicht zuletzt wegen der schlechten chromatographischen Trennbarkeit von Glycin und Serin kein eindeutiges Bild. Von Glutamyl-glycyl-arginin wurde Glutaminsäure abgespalten, Glycyl-arginin blieb wiederum nahezu unberührt. Vom Arginyl-glutamyl-glycin wurde Glycin fast voll-

ständig und Glutaminsäure immerhin noch deutlich wahrnehmbar abgetrennt. In der Arginyl-glycyl-glutaminsäure wurde zwar Glutaminsäure abgespalten, die arg-gly-Bindung jedoch überhaupt nicht angegriffen.

Da Arginin eine gewisse strukturelle Verwandtschaft mit Histidin zeigt, erschien der Vergleich mit den Abbauergebnissen einiger Histidylpeptide reizvoll. Eingesetzt wurden Anserin, Carnosin, Histidinamid, Histidyl-glycyl-glycin, Diglycyl-histidin, Histidyl-histidin, Glycyl-histidyl-leucin, Asparaginyl-glutaminyl-histidyl-leucinamid, Seryl-glycyl-glycyl-histidinamid und Histidyl-tryptophan. Von Pronase völlig unangegriffen blieben dabei nur Carnosin, Anserin, Histidinamid und Histidyl-tryptophan.

Eine Übersicht über sämtliche mit Pronase erzielten Abbauergebnisse findet sich in den Tabellen 3 und 4.

Tabelle 3. Pronasewirkung an Arginylpeptiden

Peptid	Bindung	Einwirkungsdauer 1 h	4 h	20 h
H-arg-gly-gly-OH	arg-gly	o	o	+
	gly-gly	o	o	o
H-gly-gly-arg-OH	gly-gly	o	o	o
	gly-arg	o	o	+
H-gly-glu-arg-OH	gly-glu	+	++	++
	glu-arg	o	o	+
H-glu-gly-arg-OH	glu-gly	+	++	++
	gly-arg	o	o	+
H-arg-gly-arg-OH	arg-gly	o	+	+
	gly-arg	o	o	+
H-arg-gly-glu-OH	arg-gly	o	o	o
	gly-glu	o	+	++
H-arg-glu-gly-OH	arg-glu	o	+	+
	glu-gly	+	++	++
H-gly-gly-glu-arg-OH	gly-gly	o	o	o
	gly-glu	+	++	++
	glu-arg	o	+	+

Zeichenerklärung: o keine erkennbare Hydrolyse
+ Teilhydrolyse
++ Totalhydrolyse

Tabelle 4. Pronasewirkung an Histidylpeptiden

Peptid	Bindung	Einwirkungsdauer 1 h	4 h	20 h
H-ser-gly-gly-his-NH_2	ser-gly	+	++	++
	gly-gly	o	o	o
	gly-his	+	++	++
	his-NH_2	+	++	++
H-his-gly-gly-OH	his-gly	+	++	++
	gly-gly	o	o	o
H-gly-gly-his-OH	gly-gly	o	o	o
	gly-his	+	++	++
H-gly-his-leu-OH	gly-his	o	+	+
	his-leu	+	++	++
H-his-his-OH	his-his	o	o	+
NH_2 NH_2				
H-asp-glu-his-leu-NH_2	asp-glu	o	o	+
	glu-his	+	++	++
	his-leu	+	++	++
	leu-NH_2	+	++	++
	asp-NH_2	o	o	+
	glu-NH_2	o	o	+

Zeichenerklärung: o keine erkennbare Hydrolyse

\+ Teilhydrolyse

++ Totalhydrolyse

b) Spaltung durch Serum

Stabilitätsuntersuchungen an Peptiden im Serum sind aus verschiedenen Gründen von Interesse. So sind z.B. die vom Organismus produzierten Peptidwirkstoffe auf ihrem Wege zum Erfolgsorgan dem Einfluss von Serumpeptidasen ausgesetzt. Geschwindigkeit und Art des Abbaues synthetischer Peptide durch Serum können Rückschlüsse auf die Wirkungsspezifitäten der Serumpeptidasen zulassen. Denn bis heute ist ungeklärt, wie die im Serum transportierten Peptidhormone dem enzymatischer Abbau entgehen. Zum anderen können pathologische Aktivitätsänderungen der Serumpeptidasen (z.B. bei Tumoren) zur Differentialdiagnose dienen[60] oder in besonders günstigen Fällen sogar Hinweise auf eventuell noch unbekannte Ursachen einer Erkrankung geben.

Als Beitrag dazu wurde die Beständigkeit der vorliegenden Arginylpeptide in Kaninchen- und Rattenserum geprüft. Dabei zeigte sich, dass die eingesetzten Peptide schon nach zehn Minuten zum grössten Teil in ihre Aminosäurebausteine aufgespalten waren. Es scheint sich jedoch zumindest in vitro ein weit auf den Seiten der Aminosäuren liegendes Gleichgewicht einzustellen, denn andererseits war noch nach zwei Stunden unverändertes Ausgangsprodukt chromatographisch nachweisbar. Eine gewisse Ausnahme machten Diglycyl-arginin und Arginyl-glycyl-glycin: Bei Diglycyl-arginin konnte erst nach 30 Minuten freigesetztes Glycin nachgewiesen werden. Von Arginyl-glycyl-glycin wurde das Arginin in der üblichen Geschwindigkeit abgetrennt, das verbleibende Glycyl-glycin dagegen war auch nach zwei Stunden erst zu etwa 20 % abgebaut. Vergleichsweise eingesetztes Glycyl-glycin zeigte gegenüber den Serumpeptidasen die gleiche Resistenz. In der Abbaugeschwindigkeit und in der Art des Abbaues war zwischen Kaninchen- und Rattenserum (Durchschnittsserum von verschiedenen Tieren) kein nennenswerter Unterschied festzustellen.

Tabelle 5. Peptidasewirkung von nativem Kaninchenserum

Peptid	Bindung	Einwirkungsdauer 10 min	30 min	2 h	20 h
H-gly-glu-arg-OH					
H-glu-gly-arg-OH					
H-arg-gly-arg-OH	sämtliche	++	++	++	+++
H-arg-gly-glu-OH	Bindungen				
H-arg-glu-gly-OH					
H-gly-gly-glu-arg-OH					
H-gly-gly-arg-OH	gly-gly	o	+	+	+++
	gly-arg	+	++	++	+++
H-arg-gly-gly-OH	arg-gly	++	++	++	+++
	gly-gly	o	+	+	+++

Zeichenerklärung:

o keine erkennbare Hydrolyse

\+ Teilhydrolyse; unumgesetztes Ausgangsprodukt überwiegt

++ nahezu vollständige Hydrolyse; Ausgangsprodukt eben noch nachweisbar

+++ Totalhydrolyse; Ausgangsprodukt nicht mehr nachweisbar

c) Einwirkung von Arginase

Bei Arginylpeptiden liegt die Untersuchung ihrer Angreifbarkeit durch Arginase nahe. Wenn dieses im wesentlichen am Harnstoffcyclus beteiligte Ferment auch auf Peptid-Arginylreste einwirken würde, so wäre unter Umständen mit einer Aktivierung oder Inaktivierung argininhaltiger Peptidwirkstoffe natürlicher oder synthetischer Herkunft zu rechnen. Der fortlaufende enzymatisch gesteuerte Zerfall des Arginylrestes in Harnstoff und einen Ornithylrest muss sich analytisch im Nachlassen bzw. Verschwinden der für Guanidylverbindungen spezifischen Sakaguchi-Farbreaktion[61] bemerkbar machen.

Von den eingesetzten Peptiden wurde nach fünfzehnstündiger Inkubation kein einziges vollständig abgebaut. Eine deutliche Abnahme der Farbintensität der Sakaguchi-Reaktion zeigten jedoch Arginyl-glycyl-glutaminsäure, Arginyl-glycyl-glycin und Arginyl-glycyl-serin, wohingegen sämtliche anderen unverändert blieben. Arginin selbst wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen (Co-aktivierte Arginase, 38°C, Phosphatpuffer pH 7,5) im Laufe einer Stunde quantitativ in Ornithin und Harnstoff gespalten. (Beschreibung der Enzymversuche s.S. 55 f.)

d) Ergebnisdiskussion der Enzymversuche

Die Versuchsergebnisse mit Trypsin, Pepsin und α-Chymotrypsin entsprachen den bereits bekannten Erfahrungen und bestätigen somit ältere Untersuchungen über die Spezifität dieser Verdauungsenzyme[58)62)63)].

Der Abbau mit L-Leucinaminopeptidase ist vor allem analytisch wertvoll. Denn er kann als Strukturbeweis für die Syntheseprodukte dienen und ist ausserdem zur Prüfung der Frage geeignet, ob etwa während der Peptidsynthese Racemisierung aufgetreten ist. Beim Vorhandensein grösserer Mengen an Racemat hätten in unseren Versuchen entsprechend grössere Mengen an nicht umgesetzten Peptiden übrig bleiben müssen, was nicht der Fall war. Eine geringe Racemisierung ist bei Peptidsynthesen höchst selten mit Sicherheit auszuschliessen;

sie war jedoch bei den vorliegenden Fällen chromatographisch nicht nachzuweisen.

Bei der Wirkungsweise der Pronase sind exakte Gesetzmässigkeiten nicht festzustellen. Ganz allgemein wurden aber Peptidbindungen an der Aminoseite und an der Carboxylseite sowohl von basischen als auch von sauren Aminosäuren gespalten. Dabei scheinen bei gleichzeitiger Anwesenheit von beiden Arten die sauren Aminosäuren den Vorzug zu haben. Dipeptide wurden nicht oder nur ausserordentlich langsam hydrolysiert. Von besonderer Stabilität war dabei Glycyl-glycin. Die Histidinamidbindung wird recht leicht gespalten, wenn sich die Aminosäure am Carboxylende eines Peptides befindet, nicht aber, wenn Histidinamid allein vorliegt. Die Amidgruppen von Glutamin und Asparagin dagegen wurden auch im Peptidverband nur sehr langsam in die freien Carboxyle überführt. Danach dürfte diese zwar sehr aktive, aber nur sehr wenig selektive Peptidase für Zwecke der Strukturaufklärung von Polypeptiden oder für die Herstellung definierter Peptidbruchstücke durch enzymatischen Abbau kaum verwendbar sein.

Erstaunlich ist der überaus rasche Abbau der meisten eingesetzten Peptide im Serum. Der Effekt scheint in erster Linie von einer oder eventuell von mehreren Aminopeptidasen herzurühren. Von besonderer Stabilität war auch hier wieder die Sequenz gly-gly. Für den Stoffwechsel von Peptidhormonen ist ein so heftiger Angriff von Seiten der Serumpeptidasen von grosser Bedeutung, denn unter diesen Bedingungen müssten vom Organismus erheblich grössere Mengen an Hormon hergestellt werden, als sie das Erfolgsorgan zum einwandfreien Funktionieren benötigt. Vermutlich bestehen aber spezifische, noch unbekannte Schutzmechanismen. So könnten z.B. diejenigen Teile der Peptidketten von Peptidwirkstoffen, die für die Wirkung in vivo ohne Bedeutung sind (vgl. Abschnitt I), neben der Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur auch die aktiven Zentren vor einem allzu schnellen Abbau durch die Serumpeptidasen schützen. Die im Vergleich zur käuflichen Leucinaminopeptidase sehr hohe Hydrolysengeschwindigkeit des Serums könnte durch das Zusammenwirken mehrerer verschiedener Aminopeptidasen zustande kommen. Sie könnte aber auch die Folge

einer Aktivierung der Peptidasen durch besondere Serumproteine oder andere noch nicht näher definierte Bestandteile des Serums sein.

Bemerkenswert sind die durch Einwirkung von Arginase erzielten Ergebnisse. Als Voraussetzungen für die Angreifbarkeit durch Arginase gelten die freie Carboxylgruppe und die unsubstituierte Guanidogruppe des Arginins[64]. GRASSMANN et al.[65] haben für diesen Fall die Anwendung von Arginase zur Endgruppenbestimmung von Proteinen und Peptiden vorgeschlagen. Untersuchungen über die Strukturspezifität der Arginasewirkung liegen aber relativ lange zurück und sind zudem nicht an Peptiden durchgeführt worden[66)67)68)69)]. Synthesen von Arginylpeptiden wurden erst später ausgearbeitet, und die nötigen Substrate waren früher nicht verfügbar. EDLBACHER und Mitarbeiter[68)69)] berichten zwar über Versuche an Arginyl-arginin, dessen Struktur sie bewiesen zu haben glaubten. Im einen Falle handelte es sich jedoch um ein nach der Methode von E.FISCHER und SUZUKI dargestelltes „Peptid", dessen Identität mit einem Gemisch aus α,δ-bis-Guanido-n-valeriansäure und Ornithin später nachgewiesen wurde[11] (vgl. S.7). Im zweiten Falle verwendeten sie eine aus Clupein isolierte Substanz, deren Natur nach allen inzwischen mit Arginin gemachten Erfahrungen zumindest zweifelhaft ist. Die vom Arbeitskreis von K.FELIX[66)67)] mit grosser Genauigkeit durchgeführten Untersuchungen beziehen sich nur auf nicht-peptidische Arginylderivate, wie z.B. auf Nitroarginin, Mono- und Dibenzoylarginin, Argininsäure, Argininester, N^{α}-Methylarginin und auf Substanzen wie Agmatin, Kreatin, Guanidin oder Guanidoessigsäure.

Nach den Befunden der vorliegenden Arbeit erscheint es fraglich, ob sich Ergebnisse mit den genannten Arginylderivaten ohne weiteres auf Arginylpeptide übertragen lassen. Dass die Guanidogruppe des Arginins im Peptidverband in allen Fällen nur langsam oder nicht nachweisbar abgebaut wurde, kann verschiedene Ursachen haben. So zeigen die entstehenden Ornithylpeptide möglicherweise einen starken Hemmeffekt auf den Fortgang der Arginasespaltung. (Auch Ornithin selbst wirkt, wenn auch in viel schwächerem Masse, arginasehemmend.) Weiterhin würde sich eine im Laufe der Peptidsynthese eingetre-

tene Racemisierung durch chromatographisch nicht unterscheidbare unumgesetzte Mengen an Ausgangspeptid bemerkbar machen. Dies hätte jedoch auch beim Abbau mit L-Leucinaminopeptidase auffallen müssen. Schliesslich wäre es durchaus denkbar, dass Arginin im Peptidverband generell von Arginase schwer angegriffen wird. Dadurch würden aber die Untersuchungsergebnisse von DE BARBIERI[70] in Frage gestellt: er inaktivierte Insulin durch Einwirkung von Arginase und führte den Wirkungsverlust auf den Abbau des einzigen im Insulin enthaltenen Argininrestes zurück. Möglicherweise handelte es sich hier um Nebeneffekte eines ungenügend gereinigten Arginasepräparates.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen: Bei Arginylpeptiden ist die Gegenwart einer freien Carboxylgruppe am Arginin noch keine Gewähr für Angreifbarkeit durch Arginase. Ergebnisse der Endgruppenbestimmung von Peptiden und Proteinen mittels Arginase sind demzufolge nicht eindeutig.

IV. Beschreibung der Versuche

2,5-Dioxopiperazin

104 g (0,74 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid[71] werden in einem Gemisch aus 120 ml Wasser und 75 g (0,74 Mol) Triäthylamin 50 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das danach abgeschiedene Produkt wird abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gut gewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 18,2 g = 57,2 % d.Th. Fp.: 305°C (Z)
$C_4H_6O_2N_2$ (114,04) Ber. N 24,56 Gef. N 24,52
Einwaage: 3,523 mg; $V_{korr.}$: 0,802 ml (27°C/717 Torr)

Cbo-glycyl-glycin [51]

13,5 g (0,12 Mol) 2,5-Dioxopiperazin werden mit einem Gemisch aus 73,5 ml 2-n NaOH und 45 ml Wasser geschüttelt, bis klare Lösung eintritt. Dann fügt man unter Eiskühlung und heftigem Rühren im Laufe einer halben Stunde 27 g (0,16 Mol) Carbobenzoxychlorid zu und lässt 5 Stunden weiterrühren. Der in dieser Zeit entstandene Brei wird mit wenig 2-n NaOH wieder in Lösung gebracht und die wässrige Phase zur Entfernung von überschüssigem Carbobenzoxychlorid zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Dann wird mit halbkonzentrierter HCl (1:1) angesäuert und der anfallende feinkristalline Niederschlag scharf abgesaugt.
Ausbeute: 22,5 g = 71,4 % d.Th. Fp.: 175°C
$C_{12}H_{14}O_5N_2$ (266,12) Ber. N 10,53 Gef. N 10,60
Einwaage: 3,537 mg; $V_{korr.}$: 0,347 ml (25°C/731 Torr)

Cbo-glycyl-glycyl-p-nitrophenylester

2,66 g (0,01 Mol) Cbo-glycyl-glycin werden zusammen mit 1,67 g (0,012 Mol) p-Nitrophenol in 30 ml Pyridin gelöst und nach dem Abkühlen auf -10°C eine Lösung von 2,06 g (0,10 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml Pyridin zugefügt. Nach

Stehen über Nacht im Kühlschrank wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat unter leichtem Erwärmen i.V. zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,8 g = 72,3 % d.Th. Fp.: 159-160°C

$C_{18}H_{17}O_7N_3$ (387,20) Ber. N 10,85 Gef. N 10,99

Einwaage: 2,572 mg; $V_{korr.}$: 0,259 ml (27°C/729 Torr)

Cbo-glycyl-glycyl-N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester

2,4 g (0,006 Mol) N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester[37], 2,32 g (0,006 Mol) Cbo-glycyl-glycyl-p-nitrophenylester und 1,14 g (0,006 Mol) p-Toluolsulfonsäure-monohydrat in 60 ml Tetrahydrofuran werden über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, das Lösungsmittel danach i.V. entfernt und der Rückstand in Essigester gelöst. Nach mehrmaligem Ausschütteln mit gesätt. $NaHCO_3$-Lösung und mit Wasser wird wieder i.V. zur Trokkene eingedampft und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,0 g = 51,7 % d.Th. Fp.: 160-162°C

$C_{33}H_{38}O_8N_6$ (646,33) Ber. N 12,99 Gef. N 12,62

Einwaage: 2,194 mg; $V_{korr.}$: 0,251 ml (23°C/727 Torr)

Tri-Cbo-L-arginyl-p-nitrophenylester [72]

5,76 g (0,01 Mol) Tri-Cbo-L-arginin [37] und 1,67 g (0,012 Mol) p-Nitrophenol in 30 ml Tetrahydrofuran werden auf -10°C abgekühlt und danach mit einer Lösung von 2,06 g (0,01 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml Tetrahydrofuran versetzt. Das Gemisch wird eine halbe Stunde bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt, filtriert und das Filtrat i.V. zur Trockene eingedampft. Das zurückbleibende Öl kristallisiert beim Anreiben mit Äthanol. Zweimaliges Umkristallisieren aus Äthanol liefert farblose Kristalle.

Ausbeute: 4,3 g = 61,7 % d.Th. Fp.: 126-127°C

$C_{36}H_{35}O_{10}N_5$ (697,36)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-glycyl-äthylester

1,5 g (0,002 Mol) Tri-Cbo-L-arginyl-p-nitrophenylester, 0,5 g (0,0025 Mol) Glycyl-glycyl-äthylester-hydrochlorid[44] und 0,4 ml Triäthylamin werden in 50 ml Essigester gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der nach dieser Zeit ausgefallene Niederschlag wird scharf abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,3 g = 84,2 % d.Th. Fp.: 168-170°C

$C_{36}H_{42}O_{10}N_6$ (718,36) Ber. N 11,69 Gef. N 11,85

Einwaage: 3,456 mg; $V_{korr.}$: 0,375 ml (26°C/727 Torr)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-glycyl-benzylester

Methode 1

3,49 g (0,005 Mol) Tri-Cbo-L-arginyl-p-nitrophenylester, 1,29 g (0,005 Mol) Glycyl-glycyl-benzylester-hydrochlorid[73] und 0,7 ml Triäthylamin werden in 50 ml Chloroform gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Lösung wird danach mehrmals mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung, mit 2-n HCl und mit Wasser ausgeschüttelt und mit festem Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abdampfen des Chloroforms i.V. verbleibt eine kristalline Masse, die aus Alkohol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 3,0 g = 76,9 % d.Th. Fp.: 113-114°C

$C_{41}H_{44}O_{10}N_6$ (780,41) Ber. N 10,77 Gef. N 10,83

Einwaage: 3,671 mg; $V_{korr.}$: 0,358 ml (25,8°C/739 Torr)

Methode 2

2,59 g (0,01 Mol) Glycyl-glycyl-benzylester-hydrochlorid werden in einem Gemisch aus 20 ml Dimethylformamid und 1,4 ml Triäthylamin gelöst und nach einstündigem Stehen bei 4°C in eine auf -10°C gekühlte Lösung von 5,76 g (0,01 Mol) Tri-cbo-L-arginin und 2,06 g (0,01 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml Dimethylformamid einfiltriert und das Ganze über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat i.V. zur Trockene eingedampft. Man löst das verbleibende Öl in 20 ml Chloroform, filtriert nochmals, entfernt das Lösungsmittel i.V. und kristallisiert den Rückstand aus Alkohol um.

Ausbeute: 4,1 g = 52,6 % d.Th. Fp.: 113-115°C
Der Mischschmelzpunkt mit nach Methode 1 hergestelltem Material zeigt keine Depression.

Cbo-glycyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester

2,1 g (0,01 Mol) Cbo-glycin und 1,4 ml Triäthylamin werden in 50 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und bei -10°C unter Rühren mit 0,95 ml Chlorkohlensäureäthylester versetzt. Nach 20 Minuten wird eine Lösung von 2,37 g (0,01 Mol) L-Glutaminsäure-γ-benzylester[50] in einem Gemisch aus 20 ml Wasser und 1,4 ml Triäthylamin zugegeben, weitere zwei Stunden gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach entfernt man das Lösungsmittel i.V., nimmt den Rückstand in halbgesättigte $NaHCO_3$-Lösung auf, schüttelt mit Äther aus und säuert die wässrige Phase mit n-HCl an. Das ausfallende Öl wird in Essigester gelöst, die Lösung mit n-HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und in die vier- bis fünffache Menge Petroläther gegossen. Das anfallende Öl kristallisiert nach einiger Zeit im Kühlschrank, wenn man die überstehende Flüssigkeit durch frischen Petroläther ersetzt. Es bilden sich farblose Nadeln, die man nochmals aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.
Ausbeute: 2,5 g = 58,4 % d.Th. Fp.: 101-102°C
$C_{22}H_{24}O_7N_2$ (428,22) Ber. N 6,54 Gef. N 6,44
Einwaage: 5,15 mg; Verbrauch: 1,15 ml 0,02 n-HCl

Cbo-glycyl-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-(N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester)

2,14 g (0,005 Mol) Cbo-glycyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester, 1,99 g (0,005 Mol) N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester und 0,95 g (0,005 Mol) p-Toluolsulfonsäure-monohydrat werden unter heftigem Schütteln in 40 ml Tetrahydrofuran gelöst und nach dem Abkühlen auf -5°C mit 1,13 g (0,0055 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank werden 1 ml Eisessig und 5 Tropfen Wasser zugefügt und nach einer Stunde bei Raumtemperatur der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat wird i.V. zur Trockene

eingedampft, und der in Essigester aufgelöste Rückstand mit verdünnter Essigsäure, halbgesättigter $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen. Der Peptidester wird danach mit Petroläther ausgefällt und mehrmals aus Methanol/Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 1,5 g = 37,1 % d.Th. Fp.: 154-155°C
$C_{43}H_{48}O_{10}N_6$ (808,43) Ber. N 10,39 Gef. N 10,51
Einwaage: 3,51 mg; $V_{korr.}$: 0,334 ml (21,8°C/725 Torr)

Cbo-glycyl-glycyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester

2,66 g (0,01 Mol) Cbo-glycyl-glycin und 1,4 ml Triäthylamin werden in 50 ml abs. Tetrahydrofuran bei -5°C mit 0,95 ml Chlorkohlensäureäthylester zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Nach 20 Minuten fügt man eine Lösung von 2,37 g (0,01 Mol) L-Glutaminsäure-γ-benzylester in einem Gemisch aus 30 ml Wasser und 2,8 ml Triäthylamin zu, lässt weitere zwei Stunden rühren und über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Dann wird das Lösungsmittel i.V. entfernt, der Rückstand in halbgesättigter $NaHCO_3$-Lösung gelöst, mit Äther gewaschen und die wässrige Phase mit n-HCl angesäuert. Das anfallende Öl wird in Essigester aufgenommen, die Lösung mit n-HCl und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und in das vier- bis fünffache Volumen Petroläther gegossen. Es bilden sich nach kurzer Zeit farblose Kristalle, die sich aus Essigester/Petroläther gut umkristallisieren lassen.
Ausbeute: 3,2 g = 65,9 % d.Th. Fp.: 147°C
$C_{24}H_{27}O_8N_3$ (485,24) Ber. N 8,65 Gef. N 8,64
Einwaage: 9,66 mg; Verbrauch: 2,98 ml 0,02 n-HCl

Cbo-glycyl-glycyl-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-(N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzlyester)

2,42 g (0,005 Mol) Cbo-glycyl-glycyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester, 1,99 g (0,005 Mol) N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester und 0,95 g (0,005 Mol) p-Toluolsulfonsäure-monohydrat werden in 40 ml Dimethylformamid gelöst und die Mischung nach dem Abkühlen auf -5°C mit einer Lösung von 1,03 g (0,005 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml Dimethylformamid ver-

einigt. Man lässt das Ganze über Nacht im Kühlschrank stehen, filtriert und dampft das Filtrat i.V. unter leichtem Erwärmen zur Trockene ein. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, die Lösung nochmals filtriert und mit verdünnter $NaHCO_3$-Lösung, verdünnter HCl und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 giesst man in die vier- bis fünffache Menge Petroläther. Das ausfallende Öl erstarrt in der Kälte zu einer festen Masse, die aus Methanol/Äther umkristallisiert werden kann.

Ausbeute: 2,8 g = 64,7 % d.Th. Fp.: 150-152°C

$C_{45}H_{51}O_{11}N_7$ (865,45)

Ber. C 62,44 H 5,89 N 11,32

Gef. C 60,78 H 5,91 N 11,46

Einwaage: 3,219 mg; $V_{korr.}$: 0,334 ml (21,5°C/724 Torr)

Einwaage: 4,167 mg; 9,28 mg CO_2, 2,20 mg H_2O

Cbo-L-glutaminsäure-γ-benzylester-dicyclohexylammoniumsalz [52]

11,85 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester und 10 g $NaHCO_3$ werden in 500 ml Wasser von 65°C gelöst und unter heftigem Rühren mit 10 ml Carbobenzoxychlorid versetzt. Man rührt 50 Minuten, ohne weiter zu erhitzen und kühlt das Reaktionsgemisch danach auf 15-20°C ab. Die Lösung wird ausgeäthert und die wässrige Phase mit konz. HCl angesäuert. Das ausfallende Öl wird in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung gut mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 25 ml Äthanol gelöst und mit 5,5 g Dicyclohexylamin versetzt. Das Salz kristallisiert bereits nach kurzem Stehen bei Raumtemperatur nahezu vollständig aus.

Ausbeute: 14,6 g = 52,9 % d.Th. Fp.: 141-143°C

$C_{32}H_{44}N_2O_6$ (552,32)

Cbo-glycyl-p-nitrophenylester

4,18 g (0,02 Mol) Cbo-glycin [74] und 3,34 g (0,024 Mol) p-Nitrophenol in 30 ml Pyridin werden bei -5°C mit einer Lösung von 4,12 g (0,02 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml Pyridin vereinigt und über Nacht im Kühlschrank belassen.

Danach saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i.V. zur Trockene ein und kristallisiert den Rückstand aus Äthanol/Petroläther um. Farblose Blättchen.
Ausbeute: 5,2 g = 78,8 % d.Th. Fp.: 124°C
$C_{16}H_{14}O_6N_2$ (330,16)

Glycyl-p-nitrophenylester-hydrobromid [46)]

5 g Cbo-glycyl-p-nitrophenylester werden in 30 ml 2-n HBr in Eisessig eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Während dieser Zeit kristallisiert ein Teil des Hydrobromides bereits aus. Die Kristallisation wird durch Zugabe von abs. Äther vervollständigt. Man zentrifugiert die entstandenen farblosen Prismen ab und wäscht mehrmals mit abs. Äther, bis kein Geruch nach Benzylbromid mehr festzustellen ist.
Ausbeute: 4,13 g = 98,5 % d.Th. Fp.: 214-215°C (Z)
$C_8H_9O_4N_2Br$ (276,99) Ber. Br 28,84 Gef. Br 28,69
Einwaage: 28,04 mg; Verbrauch: 0,2013 ml 0,5-n $AgNO_3$

Bromwasserstoff in Eisessig

Bromwasserstoff wird durch Zutropfen von Brom zu Tetralin entwickelt, das auf dem siedenden Wasserbad erwärmt wird. Das Gas wird in einer ebenfalls mit Tetralin gefüllten Waschflasche von Spuren anhaftendem Broms befreit und in über Acetanhydrid destillierten Eisessig eingeleitet. Den Gehalt stellt man anhand der Gewichtszunahme fest.

Cbo-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-glycyl-p-nitrophenylester

5,52 g (0,01 Mol) Cbo-L-glutaminsäure-γ-benzylester-dicyclohexylammoniumsalz werden unter leichtem Erwärmen in 40 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 5 ml 2-n HCl in Tetrahydrofuran versetzt. Nach Absaugen des augenblicklich abgeschiedenen Dicyclohexylamin-hydrochlorids wird die Lösung auf -5°C abgekühlt und unter Rühren nacheinander 1,4 ml Triäthylamin und 0,95 ml Chlorkohlensäureäthylester zugefügt. Nach 15 Minuten gibt man 2,78 g (0,01 Mol) Glycyl-p-nitrophenylester-hydrobromid (in fester Form) zu und lässt im Laufe einer weiteren

Viertelstunde eine Lösung von 1,4 ml Triäthylamin in 30 ml Tetrahydrofuran unter heftigem Rühren zutropfen. Man rührt noch zwei Stunden ohne Kühlung weiter und lässt dann über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Danach wird das Lösungsmittel i.V. entfernt und der Rückstand in 200 ml Essigester gelöst. Nach Waschen mit 2-n HCl und Wasser wird die Lösung über Na_2SO_4 getrocknet und abermals eingedampft. Der kristalline Rückstand lässt sich aus Alkohol umkristallisieren. Es entstehen lange farblose verfilzte Nadeln.

Ausbeute: 3,5 g = 63,7 % d.Th. Fp.: 157-158°C

$C_{28}H_{27}O_9N_3$ (549,28) Ber. N 7,65 Gef. N 7,69

Einwaage: 4,584 mg; $V_{korr.}$: 0,313 ml (27°C/753 Torr)

Cbo-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-(glycyl-N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester)

1,99 g (0,005 Mol) N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester, 0,95 g (0,005 Mol) p-Toluol-sulfonsäure-monohydrat und 2,74 g (0,005 Mol) Cbo-L-glutamyl-(γ-benzylester)-α-(glycyl-p-nitrophenylester) werden nacheinander in der angegebenen Reihenfolge in 70 ml Chloroform gelöst und die Lösung über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann schüttelt man so lange mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung aus, bis die wässrige Schicht nur noch schwach gelb gefärbt ist. Hierauf wird die organische Schicht mit verdünnter Essigsäure und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und i.V. zur Trockene eingedampft. Nach mehrmaligem Umfällen des Rückstandes aus Isopropanol/Wasser und Methanol/Äther erhält man ein amorphes farbloses Pulver, das ab 108° unscharf zu schmelzen beginnt.

Ausbeute: 2,2 g = 54,5 % d.Th.

$C_{43}H_{48}O_{10}N_6$ (808,43)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylester

5,76 g (0,01 Mol) Tri-Cbo-L-arginin und 1,4 ml Triäthylamin in 50 ml abs. Chloroform werden auf -5°C abgekühlt und mit 0,95 ml Chlorkohlensäureäthylester versetzt. Nach 15 Minuten gibt man 2,77 g (0,01 Mol) Glycin-p-nitrophenylester-hydrobromid hinzu und lässt im Laufe einer weiteren Viertelstunde

eine Lösung von 1,4 ml Triäthylamin in 30 ml Chloroform unter heftigem Rühren zutropfen. Man rührt nach zwei Stunden ohne Kühlung weiter und lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Ein eventuell schon nach dieser Zeit ausgefallener Teil des Rohproduktes wird abfiltriert. Die Reaktionslösung wird nach dem Waschen mit 2-n HCl und Wasser über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. zur Trockene eingedampft. Die vereinigten Rohprodukte ergeben nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform/Äther farblose Kristalle.

Ausbeute: 4,5 g = 59,7 % d.Th. Fp.: 190-191°C

$C_{38}H_{38}O_{11}N_6$ (754,38) Ber. N 11,13 Gef. N 11,24

Einwaage: 3,569 mg; $V_{korr.}$: 0,366 ml (22,4°C/724 Torr)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester

1,99 g (0,005 Mol) N^{ω}-Cbo-L-arginyl-benzylester, 0,95 g (0,005 Mol) p-Toluolsulfonsäure-monohydrat und 3,77 g (0,005 Mol) Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylester werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wird das Lösungsmittel i.V. entfernt, der feste Rückstand mit Äther extrahiert und in Essigester aufgenommen. Man wäscht die Lösung mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung, 2-n HCl und Wasser und dampft sie i.V. zur Trockene ein. Der Rückstand wird aus Isopropanol und Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 2,9 g = 57,3 % d.Th. Fp.: 105-110°C

$C_{53}H_{59}O_{12}N_9$ (1013,53) Ber. N 12,43 Gef. N 12,00

Einwaage: 4,061 mg; $V_{korr.}$: 0,449 ml (20,5°C/724 Torr)

Cbo-L-glutaminsäure-(γ-methylester)-α-p-nitrophenylester

Eine auf -5° abgekühlte Lösung von 8,85 g (0,03 Mol) Cbo-L-glutaminsäure-γ-methylester[49] und 4,86 g (0,035 Mol) p-Nitrophenol in 40 ml Pyridin wird mit 6,18 g (0,03 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat i.V. zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus Methanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 7,5 g = 60,1 % d.Th. Fp.: 102-103°C

$C_{20}H_{20}O_8N_2$ (416,20) Ber. N 6,73 Gef. N 6,55
Einwaage: 4,006 mg; $V_{korr.}$: 0,238 ml (25°C/731 Torr)

L-Glutaminsäure-(γ-methylester)-α-p-nitrophenylester-hydrobromid [75]

4,16 g der vorstehenden Carbobenzoxyverbindung werden in 40 ml 2-n HBr in Eisessig gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Hydrobromid kristallisiert nach Zugabe von abs. Äther aus. Es wird abzentrifugiert und so lange mit Äther gewaschen, bis es nicht mehr nach Benzylbromid riecht.
Ausbeute: 3,4 g = 97,4 % d.Th. Fp.: 168-170°C
$C_{12}H_{15}O_6N_2Br$ (363,03) Ber. Br 22,01 Gef. Br 21,88
Einwaage: 29,6 mg; Verbrauch: 0,1621 ml 0,5-n $AgNO_3$

Tri-Cbo-L-arginyl-L-glutamyl-(γ-methylester)-α-p-nitrophenylester

5,76 g (0,01 Mol) Tri-Cbo-L-arginin und 1,4 ml Triäthylamin in 50 ml abs. Chloroform werden auf -5° abgekühlt und mit 0,95 ml Chlorkohlensäureäthylester versetzt. Nach 15 Minuten gibt man 3,49 g (0,01 Mol) L-Glutaminsäure-(γ-methylester)-α-p-nitrophenylester-hydrobromid zu und lässt im Laufe einer weiteren Viertelstunde eine Lösung von 1,4 ml Triäthylamin in 30 ml Chloroform unter heftigem Rühren langsam zutropfen. Man rührt noch zwei Stunden und lässr dann über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Die Lösung wird danach mit 2-n HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. zur Trockene eingedampft. Der feste Rückstand lässt sich aus Essigester umkristallisieren.
Ausbeute: 6,02 g = 71,7 % d.Th. Fp.: 148-149°C
$C_{42}H_{44}O_{13}N_6$ (840,42) Ber. N 10,0 Gef. N 10,29
Einwaage: 3,162 mg; $V_{korr.}$: 0,292 ml (25°C/739 Torr)

Tri-Cbo-L-arginyl-L-glutamyl-(γ-methylester)-α-(glycyl-äthylester)

0,93 g Glycinäthylester-hydrochlorid[71] werden in einem Gemisch aus 10 ml Dimethylformamid und 0,95 ml Triäthylamin gelöst und in eine, durch leichtes Erwärmen hergestellte Lösung von 5,6 g Tri-Cbo-L-arginyl-L-glutamyl-(γ-methylester)-α-p-nitrophenylester in 50 ml Dimethylformamid einfiltriert. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel i.V. entfernt, der feste Rückstand mehrmals mit Äther extrahiert und aus Methanol umkristallisiert. Es entstehen farblose verfilzte Nadeln.

Ausbeute: 4,5 g = 55,9 % d.Th. Fp.: 171-172°C

$C_{40}H_{48}O_{12}N_6$ (804,40)

Ber. C 59,72 H 5,97

Gef. C 59,68 H 5,94

Einwaage: 4,129 mg; 9,03 mg CO_2, 2,19 mg H_2O

Tri-Cbo-L-arginyl-L-glutamyl-α-glycin

6,1 g Tri-Cbo-L-arginyl-L-glutamyl-(γ-methylester)-α-(glycyl-äthylester) werden in einem Gemisch aus 100 ml Tetrahydrofuran und 20 ml n-NaOH eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei fast vollständige Lösung eintritt. Dann wird abfiltriert, das Tetrahydrofuran i.V. entfernt und der zurückbleibende wässrige Schlamm mit n-HCl angesäuert. Der entstehende feinkristalline Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Wasser neutral gewaschen und nochmals aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 2,5 g = 43,3 % d.Th. Fp.: 123-125°C

$C_{37}H_{42}O_{12}N_6$ (762,37)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-L-glutaminsäure-dibenzylester

Zu einer Lösung von 3,14 g L-Glutaminsäure-dibenzylesterhydrochlorid[76] in 50 ml Dimethylformamid werden 1,25 ml Triäthylamin gegeben und das ausfallende Triäthylamin-hydrochlorid nach einigem Stehen in der Kälte abgesaugt. Das Filtrat wird mit weiteren 50 ml Dimethylformamid und mit 6,5 g Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylester versetzt, leicht erwärmt, bis klare Lösung eintritt und über Nacht bei Raum-

temperatur belassen. Dann entfernt man das Dimethylformamid i.V., extrahiert den festen Rückstand mehrmals mit Äther und kristallisiert aus Essigester/Petroläther um.

Ausbeute: 6,0 g = 73,9 % d.Th. Fp.: 157-160°C

$C_{51}H_{54}O_{12}N_6$ (942,51) Ber. N 8,92 Gef. N 9,43

Einwaage: 3,023 mg; $V_{korr.}$: 0,258 ml (27°C/739 Torr)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-benzylester

4,39 g (0,01 Mol) L-Phenylalanyl-benzylester-p-toluolsulfonat[37] werden zusammen mit 1,4 ml Triäthylamin in 50 ml Dimethylformamid gelöst und das ausgefallene Triäthylammonium-p-toluolsulfonat nach einstündigem Stehen im Kühlschrank abgesaugt. Zum Filtrat fügt man 7,54 g (0,01 Mol) Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylester und weitere 50 ml Dimethylformamid. Nach leichtem Erwärmen tritt vollständige Lösung ein. Die Reaktionsmischung wird nun 12 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt, i.V. vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Chloroform gelöst und die Lösung sechs bis acht mal mit halbgesättigter $NaHCO_3$-Lösung, zweimal mit 2-n HCl und zweimal mit Wasser gewaschen. Die nach Abdestillieren des Chloroforms verbleibende Masse wird aus Isopropanol und aus Aceton/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 6,0 g = 68,9 % d.Th. Fp.: 140-141°C

$C_{48}H_{50}O_{10}N_6$ (870,48)

Ber. C 66,19 H 5,74

Gef. C 64,73 H 5,48

Einwaage: 4,292 mg; 9,03 mg CO_2, 2,19 mg H_2O

DL-Serin-benzylester-p-toluolsulfonat

10,5 g DL-Serin, 19 g p-Toluolsulfonsäure-monohydrat, 150 ml Benzylalkohol und 200 ml Benzol werden zusammen unter Rückfluss gekocht, wobei der Kühler mit einem Wasserabscheider zu versehen ist. Nachdem kein Wasser mehr übergeht, lässt man noch vier Stunden weiterkochen, entfernt dann Benzol und überschüssigen Benzylalkohol i.V. und kristallisiert den Rückstand mehrmals aus Essigester um.

Ausbeute: 2,33 g = 63,5 % d.Th. Fp.: 96-99°C

$C_{17}H_{21}O_6NS$ (376,23)

Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-DL-seryl-benzylester

2,5 g DL-Serin-benzylester-p-toluolsulfonat werden in 15 ml Dimethylformamid gelöst und mit 1 ml Triäthylamin versetzt. Nach einer Stunde Stehen im Kühlschrank filtriert man in eine Lösung von 4,85 g Tri-Cbo-L-arginyl-glycyl-p-nitrophenylester in 50 ml Dimethylformamid ein und lässt das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Danach wird das Lösungsmittel i.V. abgedampft und der gelatinöse Rückstand mehrmals aus Chloroform/Äther und aus Alkohol umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator verbleibt ein farbloses Kristallpulver.
Ausbeute: 3,5 g = 67,2 % d.Th. Fp.: 125-130°C
$C_{42}H_{46}O_{11}N_6$ (810,00) Ber. N 10,37 Gef. N 10,41
Einwaage: 3,305 mg; $V_{korr.}$: 0,311 ml (26,9°C/739 Torr)

Entfernung der Schutzgruppen

Die Carbobenzoxypeptidbenzylester (bzw. in einem Falle - s.S.52 - das Carbobenzoxypeptid) wurden in Mengen von 2-5 g in 10 ml Methanol gelöst, die Lösung mit 2 ml Eisessig versetzt und in geschlossener Apparatur hydriert (Normaldruck, Zimmertemperatur). Als Katalysator dienten je 500 mg Aktivkohle mit 10 % Palladium, die vor der Zugabe der zu hydrierenden Substanz in methanolischer Suspension mit Wasserstoff beladen wurden. Nach 4 bis 5 Stunden wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat i.V. unter leichtem Erwärmen zur Trokkene eingedampft, der Rückstand in Eisessig gelöst und nochmals mit derselben Menge Katalysator nachhydriert. (In Fällen, wo der geschützte Peptidester methanolunlöslich war, wurde von vornherein Eisessig als Lösungsmittel verwendet.) Nach weiteren 2 Stunden wurde das Eindampfen wiederholt und der Rückstand mehrmals aus Wasser/Alkohol und Wasser/Aceton umgefällt. Eine manchmal auftretende Gelbfärbung der wässrigen Lösung liess sich durch kurzes Aufkochen mit Aktivkohle beseitigen.

Potentiometrische Titrationen zur pK-Bestimmung

Je 0,1 mMol des zu untersuchenden Peptides wurden in 10 ml einer 0,1-molaren KCl-Lösung ($J \sim 0{,}1$) gelöst und mit 0,5-n KOH automatisch titriert. Dazu wurde ein Titrator Type TTT 1a, gekoppelt mit einem Titrigraphen Type SBR 2b (beide Geräte von der Firma Radiometer Kopenhagen) verwendet.

Chromatographie

Die chromatographische Untersuchung der freien Peptide erfolgte auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G, Firma E.Merck AG, Darmstadt) oder auf Papier in mehreren Laufmittelsystemen. Entwickelt wurde mit Ninhydrin und im Falle der Papierchromatogramme auch mit Sakaguchi-Reagens[61]. (Laufmittelsysteme und R_f-Werte s.S.20 u. 21.)

Enzymversuche

Proteolytische Fermente

Jeweils 0,01 mMol der zu untersuchenden Peptide wurden in 0,5 ml Enzym-Puffer-Lösung (s.u.) gelöst und in einem verschlossenen Gefäss über verschiedene Zeiträume (10 Min. bis 20 Std.) mit Hilfe eines Ultra-Thermostaten (Firma Gebrüder Hanke, Berlin) bei 38°C inkubiert. Danach wurden die Gemische zur Inaktivierung der Enzyme 2 Minuten auf 90°C erhitzt und Proben zur Chromatographie entnommen.

Folgende Enzym-Puffer-Lösungen wurden aus käuflichen Enzympräparaten hergestellt:

1 mg Trypsin (C.F.Boehringer u.Söhne, Mannheim) in 10 ml Phosphatpuffer pH 8,0

1 mg α-Chymotrypsin (C.F.Boehringer u.Söhne, Mannheim) in 10 ml Phosphatpuffer pH 8,0

1 mg Pepsin (3 x cryst., Nutritional Biochem.Corp.,Cleveland, Ohio) in 10 ml Glycin-HCl-Puffer pH 3,0

20 mg L-Leucinaminopeptidase (August Hedinger, Stuttgart) in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,5

10 mg Pronase (B grade, California Corp.for Biochem. Research, Los Angeles) in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,5

Die Aktivität von Trypsin wurde an Benzoylargininamid, die von L-Leucinaminopeptidase an L-Leucyl-glycin geprüft. Die chromatographischen Untersuchungen erfolgten auf Kieselgel-G-Dünnschichtplatten im System n-Propanol/konz. Ammoniak 67:33. Entwickelt wurde mit Ninhydrin und im Falle der Histidinderivate auch mit Paulys Reagens[77].

Serum

Frisches Kaninchen- oder Rattenblut wurde über Nacht bei + 4°C im Kühlschrank belassen, danach zentrifugiert und das überstehende Serum abpipettiert. Jeweils 0,5 ml davon wurden mit 0,01 mMol der einzelnen Substrate vermischt, auf die oben beschriebene Weise inkubiert, chromatographiert und entwickelt.

Arginase

Je 1 ml einer Lösung von 5 mg Arginase (Nutritional Biochem. Corp., Cleveland, Ohio) in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,5 wurde mit 0,005 ml einer 10^{-3} molaren $CoCl_2$-Lösung versetzt und 5 Stunden bei 38°C aktiviert. Danach wurde das zu untersuchende Peptid (0,01 mMol) zugegeben und über verschiedene Zeiträume (10 Min. bis 15 Std.) bei 38°C inkubiert. Der Abbau der Guanidylgruppe wurde mit der Sakaguchi-Reaktion[61] verfolgt.

Analysen

Die CH-Bestimmungen wurden vom mikroanalytischen Laboratorium Alfred Bernhardt, Mülheim/Ruhr nach der Verbrennungsmethode ausgeführt.

Die Stickstoffbestimmungen erfolgten am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen nach der Methode von Dumas und im Falle von nichtargininhaltigen Zwischenprodukten nach Kjeldahl.

Die Halogenanalysen der Hydrohalogenide wurden am selben Institut durch Titration mit Silbernitrat unter potentiometrischer Bestimmung des Umschlagspunktes ausgeführt.

Schmelzpunkte

Sämtliche Schmelzpunkte wurden auf einem Gerät nach Tottoli (Firma Büchi, Flawil/Schweiz) bestimmt und sind unkorrigiert.

V. Zusammenfassung

Neun bisher nicht beschriebene Tripeptide und ein Tetrapeptid des Arginins wurden synthetisch dargestellt: H-gly-gly-L-arg-OH, H-L-arg-gly-gly-OH, H-gly-L-glu-L-arg-OH, H-L-glu-gly-L-arg-OH, H-L-arg-gly-L-arg-OH, H-L-arg-L-glu-gly-OH, H-L-arg-gly-L-glu-OH, H-L-arg-gly-L-phe-OH, H-gly-gly-L-glu-L-arg-OH und H-L-arg-gly-DL-ser-OH.

Die Amino- und Guanidogruppen wurden durch Carbobenzoxylierung und Tritylierung, die Carboxylgruppen durch Veresterung geschützt. Die Dipeptid-Zwischenprodukte wurden über „gemischte Anhydride" synthetisiert, die Verknüpfung zum Tripeptid erfolgte nach der Methode der „aktivierten Ester" oder mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. (Die Sequenz gly-gly liess sich auch durch halbseitige alkalische Hydrolyse von 2,5-Dioxopiperazin gewinnen.) Das Tetrapeptid wurde vom Aminoende her über „gemischte Anhydride" und in der letzten Stufe ebenfalls mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid dargestellt.

Sämtliche Zwischenprodukte lassen sich auch zur Synthese längerkettiger Arginylpeptide verwenden.

Die freien Peptide wurden von α-Chymotrypsin nicht angegriffen; Trypsin spaltete N-terminales Arginin von H-arg-gly-arg-OH, Pepsin Phenylalanin von H-arg-gly-phe-OH. L-Leucinaminopeptidase führte zu Totalabbau in allen Fällen. Pronase (Protease aus Streptomyces griseus) zeigte starke Spaltungseffekte ohne erkennbare Strukturspezifität.

In Ratten- und Kaninchenserum wurden sämtliche eingesetzten Peptide in kurzer Zeit totalhydrolysiert.

Von Arginase wurden die freien Peptide nur langsam oder überhaupt nicht angegriffen. Das Postulat einer freien Arginin-Carboxylgruppe als ausreichendes Substratkriterium für die Arginaseaktivität konnte nicht bestätigt werden.

VI. Literaturverzeichnis

1) D.Ackermann et al. Ber.der Physikal.-Med.Ges. Würzburg 70, 1 (1962)

2) N.Van Thoai und J.Roche, Exp.ann.biochim.méd. 18,165 (1956)

3) E.Werle, Angew.Chem. 73, 689 (1961)

4) P.G.Katsoyannis und V.DuVigneaud, J.biol.Chemistry 233, 1352 (1958)

R.O.Studer und V.DuVigneaud, J.Amer.chem.Soc. 82, 1499 (1960)

5) R.A.Boissonnas, St.Guttmann, B.Berde und H.Konzett, Experientia [Basel] 17, 377 (1961)

6) E.L.Smith und J.R.Kimmel, The Enzymes, 2.Aufl. 1960, Bd.4, S.147

R.L.Hill und E.L.Smith, Fed.Proc. 14, 226 (1955)

R.L.Hill und E.L.Smith, Biochim.Biophys.Acta 19, 376 (1956)

R.L.Hill und E.L.Smith, J.biol.Chemistry 231, 117 (1958)

7) J.E.Folk und J.A.Gladner, Biochim.Biophys.Acta 44,383(1960)

8) B.F.Erlanger, Proc.Nat.Acad.Sc. 46, 1430 (1960)

9) J.Roche und M.Mourgue, Compt.Rend. Séances Acad.Sci. 224, 860 (1947)

L.Hellermann und C.C.Stock, J.biol.Chemistry 125,771 (1938)

D.M.Greenberg, The Enzymes, 2.Aufl. 1960, Bd.4, S.261

10) E.Fischer und U.Suzuki, Ber.dtsch.chem.Ges. 38,4173 (1905)

11) L.Zervas und M.Bergmann, ibid. 61, 1195 (1928)

12) M.Bergmann und H.Köster, Z.Physiol-Chem. 167, 91 (1927)

13) J.S.Fruton, Advances in Protein Chemistry V, 1949,S.64

K.Felix und K.Dirr, Z.Physiol.Chem. 176, 29 (1928)

H.T.Clarke und H.B.Gillespie, J.Amer.chem.Soc. 54,1964(1932)

14) M.Bergmann, L.Zervas und H.Rinke, Z.Physiol.Chem. 224, 40 (1934)

15) A.Kossel und E.L.Kennaway, ibid. 72, 489 (1911)

16) R.Paul, G.W.Anderson und F.M.Callahan, J.org.Chemistry 26,3347 (1961)

17) J.S.Fruton, Advances in Protein Chemistry V, 1949, S.64

18) D.T.Gish und F.H.Carpenter, J.Amer.chem.Soc. 75,5872(1953)

19) G.W.Anderson, ibid. 75, 6081 (1953)

20) R.A.Boissonnas, St.Guttmann, P.-A.Jaquenoud, E.Sandrin und J.P.Waller, Helv.chim.Acta 44,123 (1961)

21) D.T.Gish und V.DuVigneaud, J.Amer.chem.Soc. 79, 3579 (1957)

22) H.Gibian und E.Schröder, Liebigs Ann.Chem. 642, 145 (1961)

23) H.O. van Orden und E.L.Smith, J.biol.Chem. 208, 751 (1954)

24) K.Hofmann, W.D.Peckham und A.Rheiner, J.Amer.chem.Soc. 78, 238 (1956)

K.Hofmann, A.Rheiner und W.D.Peckham, ibid. 75, 6083 (1953)

K.Hofmann, M.E.Woolner, G.Spühler und E.T.Schwartz, ibid. 80, 1486 (1958)

K.Hofmann, T.A.Thompson, H.Yajima, E.T.Schwartz und H.Inouyr, ibid. 82, 3715 (1960)

K.Hofmann, T.A.Thompson, M.E.Woolner, G.Spühler, H.Yajima, J.D.Cipera und E.T.Schwartz, ibid. 82, 3721 (1960)

K.Hofmann, E.Stutz, G.Spühler, H.Yajima und E.T.Schwartz, ibid. 82, 3727 (1960)

K.Hofmann und S.Lande, ibid. 83, 2286 (1961)

K.Hofmann und H.Yajima, ibid. 83, 2289 (1961)

K.Hofmann, T.Liu, H.Yajima, N.Yanaihara und S.Lande, ibid. 83, 2294 (1961)

25) H.Zahn und J.F.Diehl, Z.Naturforsch. 12b, 85 (1957)

26) A.F.McKay, Chem.Reviews 51, 301 (1952)

27) N.Izumiya und S.Makisumi, J.chem.Soc. Japan 78,1768 (1957); C. 1958, 13754

28) K.Hofmann, H.Kappeler, A.E.Furlenmeier, M.E.Woolner, E.T.Schwartz und T.A.Thompson, J.Amer. chem.Soc. 79, 1641 (1957)

29) R.A.Boissonnas, St.Guttmann, R.L.Huguenin, P.-A.Jaquenoud und E.Sandrin, Helv.chim.Acta 41,1867 (1958)

R.A.Boissonnas, St.Guttmann und P.-A.Jaquenoud, ibid. 43, 1349 (1960)

R.A.Boissonnas, St.Guttmann und P.A.-Jaquenoud, H.Konzett und E.Stürmer, Experientia [Basel] 16, 326 (1960)

30) W.Rittel, B.Iselin, H.Kappel er, B.Riniker und R.Schwyzer, Helv.chim.Acta 40, 614 (1957)

31) G.L.Tritsch und D.W.Wooley, J.Amer.chem.Soc. 82,2787 (1960)

32) K.Arakawa und M.Bumpus, ibid. 83, 728 (1961)

33) E.Schröder und H.Gibian, Liebigs Ann.Chem. 649, 168 (1961)

E.Schröder und H.Gibian, Z.Naturforsch. 15b, 814 (1960)

34) E.D.Nicolaides, H.A. DeWald und D.A. McCarthy, Biochem. Biophys. Research Comm. 6, 210 (1961)

E.D.Nicolaides und H.A. DeWald, J.org.Chemistry 26, 3872 (1961)

35) H.Kappeler und R.Schwyzer, Helv.chim.Acta 43, 1453 (1960)

H.Kappeler und R.Schwyzer, ibid. 44, 1136 (1961)

H.Kappeler, ibid. 44, 476 (1961)

36) C.H.Li, J.Meienhofer, E.Schnabel, D.Chung, T.B.Lo und J.Ramachandran, J.Amer.chem.Soc. 83, 4449 (1961)

E.Schnabel und C.H.Li, ibid. 82, 4576 (1960)

C.H.Li, E.Schnabel, D.Chung, T.B.Lo und J.Ramachandran, ibid. 82, 5760 (1960)

C.H.Li, E.Schnabel, D.Chung und T.B.Lo, Nature 189, 143 (1961)

E.Schnabel und C.H.Li, J.biol.Chemistry 235, 2010 (1960)

37) L.Zervas, M.Winitz und J.P.Greenstein, J.org.Chemistry 22, 1515 (1957)

L.Zervas, T.T.Otani, M.Winitz und J.P.Greenstein, J.Amer.chem.Soc. 81, 2878 (1959)

38) L.Zervas, M.Winitz und J.P.Greenstein, ibid. 83, 3300 (1961)

39) R.Schwyzer und H.Kappeler, Helv.chim.Acta 44,1991 (1961)

40) C.Gros, M.P.de Garilhe, A.Costopanagiotis und R.Schwyzer, ibid. 44, 2042 (1961)

41) R.Schwyzer, B.Iselin und M.Feurer, ibid. 38, 69 (1955)

B.Iselin, W.Rittel, P.Sieber und R.Schwyzer, ibid. 40, 373 (1957)

42) J.C.Sheehan und G.P.Hess, J.Amer.chem.Soc. 77, 1067 (1955)

43) Th.Wieland und H.Bernhard, Liebigs Ann.Chem. 572, 190 (1951)

R.A.Boissonnas, Helv.chim.Acta 34, 874 (1951)

J.R.Vaughan und R.L.Osato, J.Amer.chem.Soc. 73,3547 (1951)

44) E.Fischer und E.Furneau, Ber.dtsch.chem.Ges. 34,2878 (1901)

45) M.Goodman und G.W.Kenner, Advances in Protein Chemistry XII, 479 (1957)

46) M.Goodman und K.C.Stueben, J.Amer.chem.Soc. 81,3980 (1959)

47) L.Kisfaludy, S.Dualszky und J.Bayer, 3. Europ. Peptid-symposium Basel 1960 (Sauerländer u.Co., Aarau/Schweiz)

48) Th.Wieland, K.Freter und E.Gross, Liebigs Ann.Chem. 626, 154 (1959)

49) R.A.Boissonnas und St.Guttmann, Helv.chim.Acta 38, 1491 (1955)

50) D.W.Clayton, G.W.Kenner und R.C.Sheppard, J.chem.Soc. [London] 1956, 371

51) K.Heyns und M.Rolle, Chem.Ber. 92, 2439 (1959)

52) E.Klieger, E.Schröder und H.Gibian, Liebigs Ann.Chem. 640, 157 (1961)

53) K.Hofmann, W.D.Peckham und A.Rheiner, J.Amer.chem.Soc. 78, 238 (1956)

54) Stability Constants I, Chem.Soc. [London] (1957)

55) G.Weitzel, W.Schaeg und F.Schneider, Liebigs Ann.Chem. 632, 124 (1960)

56) W.Schaeg und F.Schneider, Z.physiol.Chem. 326,40 (1961)

57) N.C.Li und R.A.Manning, J.Amer.chem.Soc. 77, 5225 (1955)

58) P.Desnuelle, The Enzymes, 2.Aufl. Bd.4, S.131

59) M.Nomoto, Y.Narahashi und M.Murakami, J.Biochem. [Tokyo] 48, 593 (1960)

M.Nomoto, Y.Narahashi und M.Murakami, ibid. 48, 906 (1960)

60) R.J.Haschen und E.Blume, Klinische Wochenschrift 39, 466 (1961)

R.J.Haschen, Z.Physiol.Chem. 325, 164 (1961)

R.J.Haschen, Clin.chim.Acta 6, 521 (1961)

61) S.Sakaguchi, J.Biochem. [Tokyo] 5, 25 (1925)

E.Merck AG, Darmstadt, Chromatographie, 2.Aufl. S.137

R.Pant, Biochem.J. 73, 30 (1959)

R.Acher und C.Crocher, Biochim.Biophys.Acta 9, 704 (1952)

62) F.A.Bovey und S.S.Yanabi, The Enzymes, 2.Aufl. Bd.4, S.75

63) P.Desnuelle, ibid, S.115

64) D.M.Greenberg, ibid. S.261

65) W.Grassmann, H.Hörmann und O.Janowsky, Z.Physiol.Chem. 312, 273 (1958)

66) K.Felix, H.Müller und K.Dirr, ibid. 178, 192 (1928)

67) K.Felix und H.Schneider, ibid. 255, 132 (1938)

68) S.Edlbacher und P.Bonem, ibid. 145, 75 (1925)

69) S.Edlbacher und H.Burchardt, ibid. 194, 69 (1931)

70) A.De Barbieri, Boll.soc.ital.biol.sper. 25, 1 (1949)

71) E.Fischer, Ber.dtsch.chem.Ges. 28, 1150, 3252 (1894)

72) E.D.Nicolaides, H.A.DeWald, P.S.Shorley und H.O.J.Collier, Nature 187, 773 (1960)

73) L.Zervas und D.M.Theodoropoulos, J.Amer.chem.Soc. 78, 1359 (1956)

74) M.Bergmann und L.Zervas, Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1192 (1932)

75) G.Zankl, Diplomarbeit Tübingen, 1960

76) M.Liefländer, Dissertation Göttingen, 1958

77) E.Merck AG, Darmstadt, Chromatographie, 2.Aufl. S.146

L e b e n s l a u f

Am 19.Juni 1933 bin ich als Sohn des Dipl.Ing. Anton Z a n k l und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Rindt, in Politz/Elbe (Tschechoslowakei) geboren. Ich besuchte von 1939-1940 die Volksschule in Neschwitz/Elbe, von 1940-1943 die Deutsche Volksschule in Prag XIX und von 1943 bis Kriegsende die Deutsche Oberschule ebenfalls in Prag XIX. Nach einem Aufenthalt im Internierungslager Falkenau wurden wir im Sommer 1946 nach Westdeutschland ausgewiesen. Hier besuchte ich die Oberschulen Lauffen/Neckar, Heilbronn, Bad Waldsee und Ravensburg, wo ich im Winter 1952/53 das Abitur schrieb. Seit dem Sommersemester 1953 studiere ich Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, wo ich 1956 die Diplom-Vorprüfung und 1959 die Diplom-Hauptprüfung abgelegt habe. Diplom- und Doktorarbeit fertigte ich von 1959-1962 am Physiologisch-Chemischen Institut derselben Universität an.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	Buddecke, Butenandt, Lingens, Weitzel
Anorganische Chemie:	Brodersen, Rüdorff
Organische Chemie:	Hellmann, Eugen Müller, Opitz, Wittig
Physikalische Chemie:	Knappwost, Kortüm, Mauser
Physik:	Kossel, Krüger, Möllenstedt, Mühleisen
Pharmakologie:	Kiese, Pulewka
Physiologie:	Barbey, Bartels, Brecht, Pauschinger
Zoophysiologie:	Huber, Möhres
Anatomie:	Mörike
Mathematik:	Schweizer

Foto - Druck:
Chemoprint OHG
Gießen